

Série A, n° 3494  
N° d'ordre 4366

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir le grade de  
DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

ERNA VILKAS-TENENBAUM

- 1<sup>re</sup> THÈSE. - "Sur la structure chimique des phospholipides de quelques souches de Mycobactéries".
- 2<sup>e</sup> THÈSE. - Propositions données par la Faculté.

soutenues le 11 Juin 1960 devant la Commission d'examen

MM. WURMSER, Président  
LEDERER, Examinateur  
JULIA M. »



Série A, n° 3494

N° d'ordre 4366

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir le grade de  
DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

ERNA VILKAS-TENENBAUM

1<sup>re</sup> THÈSE. - "Sur la structure chimique des phospholipides de quelques souches de Mycobactéries".

2<sup>e</sup> THÈSE. - Propositions données par la Faculté.

soutenues le 11 Juin 1960 devant la Commission d'examen

MM. WURMSER, Président

LEDERER, Examinateur

JULIA M. ,



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

# FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

## PROFESSEURS

Doyen .....J. PERES

|            |                                                |              |                                                |
|------------|------------------------------------------------|--------------|------------------------------------------------|
| G. JULIA   | T Analyse supérieure<br>et algèbre supér.      | DANJON       | T Astronomie                                   |
| DE BROGLIE | T Théories physiques                           | PETIT        | T Biologie maritime                            |
| PRENANT    | T Anatomie et histol.<br>comparées             | QUENEY       | T Météorologie et dyna-<br>mique atmosphérique |
| PERES      | T Mécanique des fluides<br>et applications     | GALLIEN      | T Embryologie                                  |
| BARRABE    | T Géologie structurale<br>et Géol. appliquée   | EICHHORN     | T Biologie végétale<br>(S.P.C.N.)              |
| BOURCART   | T Géogr. physique et<br>géol. Dynamique        | DE CUGNAC    | T Biologie végétale<br>(S.P.C.N.)              |
| PLANTEFOL  | T Botanique                                    | Mle CAUCHOIS | T Chimie Physique                              |
| GRASSE     | T Evolution des êtres<br>organisés             | THELLIER     | T Physique du Globe                            |
| PREVOST    | T Chimie organique                             | L'HERITIER   | T Génétique                                    |
| BOULIGAND  | T Application de l'ana-<br>lyse à la Géométrie | GRIVET       | T Radioélectricité                             |
| CHAUDRON   | T Chimie appliquée                             | PONCIN       | T Mécanique générale                           |
| WYART      | T Minéralogie                                  | DUBREIL      | T Arithmétique et<br>théorie des nombres       |
| TEISSIER   | T Zoologie                                     | QUELET       | T Chimie organique                             |
| MANGENOT   | T Biol. Végétale                               | CAGNIARD     | T Chimie macromolécul                          |
| P. AUGER   | T Physique quantique<br>et relativité          | CHAMPETIER   | T Micropaléontologie                           |
| MONNIER    | T Physiologie générale                         | CUVILLIER    | T Micropaléontologie                           |
| PIVETEAU   | T Paléontologie                                | JUNG         | T Pétrographie                                 |
| ROCARD     | T Physique (E.N.S.)                            | TRILLAT      | T Microscopie et diffrac.<br>électronique      |
| H. CARTAN  | T Mathématiques (ENS)                          | WIEMANN      | T Chimie organique et<br>structurale           |
| LAFFITTE   | T Chimie générale                              | JACQUINOT    | T Spectroscopie et<br>physique céleste         |
| FAVARD     | T Géométrie supérieure                         | VASSY        | T Physique de l'atmos-<br>phère                |
| COULOMB    | T Physique du Globe                            | DESTOUCHES   | T Théories physiques                           |
| Mle COUSIN | T Biologie animale<br>(S.P.C.N.)               | M. PRUVOST   | T Géologie                                     |
| CHRETIEN   | T Chimie minérale                              | AMIEL        | T Chimie générale                              |
| P. DRACH   | T Zoologie                                     | HOCART       | T Minéralogie                                  |
| KASTLER    | T Physique (E.N.S.)                            | J.P. MATHIEU | T Physique (option)<br>(Orsay)                 |
| EPHRUSSI   | T Génétique                                    | COUTEAUX     | T Biol. animale (PCB)                          |
| WURMSER    | T Biologie physico-<br>chimique                | MAY          | T Zoologie (Orsay)                             |
| RIVIERE    | T Géologie (S.P.C.N.)<br>Orsay                 | CHOQUET      | T Théor. des fonct.<br>et topologie            |
| GAUTHERET  | T Biol. végétale (PCB)                         | FELDMANN     | T Biologie végétale<br>marine                  |
| LUCAS      | T Recherches physiques                         | GUINIER      | T Physique des solides                         |
| A. THOMAS  | T Biol. cellulaire                             | JOST         | T Physiol. comparée                            |
| ARNULF     | T Optique appliquée                            | FORTET       | T Calcul des prob. et<br>physique math.        |
| M. MORAND  | T Enseignement de<br>Physique                  | SCHWARTZ     | T Calcul diff. et<br>Intégr.                   |
| SOLEILLET  | T Physique (P.C.B.)                            | CHOUARD      | T Physiologie végétale                         |
| FORTIER    | T Mécanique expérim.<br>des fluides            |              |                                                |

|              |                                          |                  |                                               |
|--------------|------------------------------------------|------------------|-----------------------------------------------|
| MALAVARD     | T Aviation                               | ROUAULT          | T Physique générale                           |
| BRELOT       | T Calcul différentiel                    | GAUTHIER         | T Mécanique appliquée                         |
| NORMANT      | T Synthèse organique                     | BARCHEWITZ       | T Chimie physique                             |
| BENARD       | T Chimie minérale                        | BROSSEL          | T Physique atomique                           |
| BUVAT        | T Botanique (E.N.S.)                     | BUSER            | Physiol. comparée                             |
| DUGUE        | T Statistiques mathém.                   | CAMUS            | Physiol. vég. (3 <sup>e</sup> cycl)           |
| GELOSO       | T Chimie (S.P.C.N.)                      | CASTAING         | Physique générale                             |
| SOULAIRAC    | T Psychophysiologie                      | CURIEN           | Minéralogie et cristallographie               |
| ULRICH       | T Physiol. végétale                      | MOYSE            | T Physiol. vég. (Orsay)                       |
| MARECHAL     | T Optique théorique et appliquée         | PANNETIER        | Chimie (S.P.C.N.)                             |
| KIRRMANN     | T Théories chimiques                     | POSSOMPES        | T Zoologie                                    |
| CHAEFAUD     | T Botanique                              | PULLMANN         | Chimie théorique                              |
| Mie LE       |                                          | TEILLAC          | Physique nucléaire et Radioactivité           |
| BRETON       | T Physiol. générale                      | TONNELAT         | Biol. physico-chimique                        |
| SALEM        | T Mathématiques générales                | VILLE            | T Econométrie                                 |
| LELONG       | T Mathématiques générales                | WILLEMART        | Chimie (P.C.B.)                               |
| DEVILLERS    | T Anatomie et Histologie comparées       | DODE             | T Chimie S.P.C.N.) Orsay                      |
| EHRESMANN    | T Topologie algébrique                   | FREYMAN          | T Physique générale                           |
| FRANCON      | T Physique (S.P.C.N.)                    | GUINOCHET        | T Biol. vég. (Orsay)                          |
| GLANGEAUD    | T Géogr. physique et Géologie dynamique  | ROLLET           | T Chimie (P.C.B.)                             |
| GODEMENT     | T Mathématiques (M.G.P.)                 | Mie JOSIEN       | T Chimie (P.C.B.)                             |
| PISOT        | T Technique mathématique de la Physique  | CHEVALLEY        | T Géométrie algébrique et théorie des groupes |
| ROCH E.      | T Géologie                               | ARNOULT          | T Electronique                                |
| SCHATZMANN   | T Astrophysique                          | CHAPELLE         | T Physique (M.P.C.) Orsay                     |
| TERMIER      | T Paléontologie stratigraphique          | DELANGE          | T Mathématiques Orsay                         |
| ZAMANSKY     | T Mathématiques générales                | DENY             | T Mathématiques (M.G.P.)                      |
| LENNUIER     | T Physique (M.G.P.)                      | GERMAIN          | T Mécanique théorique des fluides             |
| RIZET        | Génétique                                | LUCAS G.         | T Géologie                                    |
| ROUTHIER     | T Géologie appliquée                     | ALLARD           | Chimie Physique                               |
| Madame       |                                          | BERTHELOT        | Phys. Nucl. et Radioactivité                  |
| TONNELAT     | T Relativité                             | BRICARD          | Météorologie et Phys. de l'atmosphère         |
| DIXMIER      | T Mathématiques (M.P.C.)                 | Mme ALBE-FESSARD | Psycho-Physiol.                               |
| SOUCHAY      | T Chimie générale                        | FRIEDEL          | Physique des Solides                          |
| AIGRAIN      | T Electrotech. générale                  | M. JULIA         | Etude des molécules organiques complexes      |
| BRUSSET      | Chimie générale                          | LENDER           | Biol. Animale (SPCN) Orsay                    |
| M. LEVY      | T Physique théorique des hautes énergies | MAGAT            | Physico-chimie des Rayonn.                    |
| Mme CHAIX    | Chimie biologique                        | Mie QUINTIN      | T Electrochimie                               |
| Mme HUREL-PY | Biol. Vég. (PCB.)                        | MONOT            | T Chimie du métabolisme                       |
| PIAUX        | Chimie (M.P.C.)                          | BENOIT           | T Physiologie animale                         |
| BRUN         | T Mécanique expérimentale des fluides    | DE POSSEL        | T Analyse numérique                           |
| LEDERER      | T Chimie biologique                      | CHARLOT          | T Chimie analytique                           |
| Mme DUBREILT | Mathématiques                            | HAISSINSKY       | T Radiochimie                                 |
| Mme LELONG   | Mathem. (E.N.S.)                         | LEMEE            | T Physiologie BMPV                            |
| BELLAIR      | T Géologie (S.P.C.N.)                    | GUERIN           | T Chimie MPC                                  |
| COTTE        | T Physique (Orsay)                       |                  |                                               |
| DUBOIS J. E. | T Chimie organique                       |                  |                                               |
| LAMOTTE      | Zoologie (E.N.S.)                        |                  |                                               |
| MICHEL A.    | T Chimie (S.P.C.N.)                      |                  |                                               |
| OLMER        | T Energétique générale                   |                  |                                               |

SECRETAIRE GENERAL..... C. MONIER

A Monsieur le Professeur Edgar LEDERER  
 en témoignage de ma profonde reconnaissance.



A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A MON MARI

A MA FILLE



Ce travail a été effectué à l'Institut de Biologie physico-chimique, dans le Service de Chimie des Substances Naturelles, sous la direction de Monsieur le Professeur E. LEDERER. Je suis heureuse de lui exprimer ici toute ma gratitude pour les précieux conseils et encouragements qu'il m'a toujours prodigués et pour toute la sollicitude qu'il m'a témoignée.

Je remercie Monsieur le Professeur R. WURMSER d'avoir bien voulu accepter la présidence de mon jury ainsi que Monsieur le Professeur M. JULIA qui a bien voulu en faire partie.

J'adresse ici à Monsieur J. JACQUES, sous-directeur au Collège de France, mes très vifs remerciements pour la bienveillance qu'il m'a toujours manifestée.

C'est pour moi un agréable devoir de remercier Madame J. POLONSKY, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui a guidé mes premiers pas dans la recherche.

Je tiens à remercier aussi tous mes camarades du laboratoire, et tout particulièrement Monsieur D. MERCIER pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus.



## INTRODUCTION

Dès 1888, Hammerschlag (1) a attiré l'attention des chercheurs sur l'extraordinaire richesse en lipides de Mycobacterium tuberculosis. Depuis, de nombreuses écoles se sont intéressées à la constitution chimique et aux propriétés biologiques de différentes fractions lipidiques.

Une importante série de publications portant sur ce sujet dues à R.J. Anderson et son équipe (2,3,4,5) ont paru avant guerre aux Etats-Unis. En France, les travaux de Lederer et ses collaborateurs (6 à 12) ont abouti à l'extension des connaissances de la chimie des lipides des Mycobactéries.

Relativement peu de recherches ont été effectuées quant à la chimie des phospholipides de M. tuberculosis. Cette étude nous a paru d'autant plus digne d'intérêt que différents auteurs attribuent les propriétés antigéniques et immunisantes aux fractions phosphatidiques.

Ainsi de nombreux travaux démontrent que les extraits alcooliques bruts de bacilles tuberculeux administrés aux animaux peuvent être utilisés comme antigènes dans la réaction de fixation du complément (\*) en présence des anticorps correspondants. Ces préparations purifiées par élimination des impuretés non lipidiques perdent leur activité in vivo mais, in vitro continuent à fixer le complément. Landsteiner (13) appelle ces antigènes incomplets, inactifs in vivo, les haptènes. Meyer (14) constate que la fraction lipidique de bacilles tuberculeux insoluble dans l'acétone possède une très importante activité hapténique. Machéboeuf, Lévy, Chambaz (15) en fractionnant les lipides riches en phosphore, peuvent attribuer la plus grande activité à la portion la moins soluble dans le mélange chloroforme-méthanol. Faure (16) conclut :

"Après de multiples fractionnements on voit l'haptène se concentrer dans une unique fraction qui ne renferme certainement pas de protéines et qui ne contient pas de glucides libres. Elle est en majeure partie constituée par des acides glycérophosphatidiques complexes qui renferment des osides et de l'inositol." D'après cet auteur l'haptène de fixation du complément présente "certaines similitudes de constitution chimique avec les acides phosphatidiques complexes".

(\*) facteur thermolabile, présent dans le sérum frais d'animaux.

D'autre part Nègre et Boquet étudient les propriétés thérapeutiques et antigéniques des extraits alcooliques des bacilles Calmette-Guérin. Les bacilles préalablement dégraissés par l'acétone sont extraits par l'alcool méthylique. L'extrait ainsi obtenu, composé principalement de phospholipides, constitue un antigène très actif in vitro et in vivo et permet de déceler les anticorps tuberculeux par la réaction de déviation du complément. Selon ces auteurs "les phospholipides bacillaires injectés préventivement en grande quantités à des animaux sains leur donnent une résistance marquée à une infection virulente d'épreuve." En dehors de son pouvoir immunisant "l'antigène méthylique" de Nègre et Boquet présente "un pouvoir antitoxique et favorise la sclérose". Il possède "le pouvoir, préventivement et curativement, de ralentir le processus tuberculeux" (17,18).

Dubos et coll. (19, 20) signalent également les propriétés immunisantes des extraits méthanoliques du bacille tuberculeux.

Les phospholipides bacillaires semblent donc jouer un rôle important dans les phénomènes d'immunité.

Les travaux de R.J. Anderson et de son école (3,21,22) montrent la complexité de ces substances. Il résulte de leurs recherches que les phospholipides de Mycobactéries diffèrent entièrement de ceux des animaux et des plantes. Ils ne contiennent pas de bases azotées et l'on y trouve une quantité importante de polysaccharides. Anderson souligne leur faible teneur en azote ( $<1\%$ ), la plus grande partie étant sous forme ammoniacale. Quant à la fraction polyosidique, sa composition paraît être très variable puisque De Sũto Nagy et Anderson (23) concluent que "chaque lot de bacilles cultivés sur milieu artificiel élabore des composés organophosphoriques différents".

Il nous a semblé intéressant d'étudier comparativement les phospholipides provenant de différentes souches de Mycobactéries, de déterminer leur structure chimique exacte, ainsi que d'identifier la fraction biologiquement active.

Pour mener à bien notre travail nous avons pu disposer des phosphatides de M. phlei (bacille de la fléole (24) vivant en saprophyte sur une graminée Phleum pratense, classé dans le groupe des bacilles paratuberculeux), de phosphatides d'une souche humaine virulente H 37 Rv streptomycino-résistante (H-37 Rv s.r.) et de la souche bovine atténuée B.C.G. (bacille Calmette-Guérin).

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

### LA CHIMIE DES PHOSPHOLIPIDES ANIMAUX ET VEGETAUX

Avant d'aborder l'étude des phospholipides bactériens, il nous semble indiqué de passer rapidement en revue les travaux relatifs aux phosphatides d'origine animale et végétale.

Les phosphatides sont caractérisés par la présence d'acides gras et d'esters d'acide phosphorique. Leur classification est basée sur l'alcool estérifiant l'acide phosphorique.

1. Glycérophosphatides.

11. Sphingophosphatides.

Certains auteurs y ajoutent un troisième groupe: les inosito-phosphatides, mais étant donné la présence de glycérol dans ces substances, elles peuvent être considérées également comme glycérophosphatides.

#### 1. GLYCEROPHOSPHATIDES.

Selon les travaux plus anciens, les glycérophosphatides étaient divisés en lécithines, solubles dans l'alcool et contenant de la choline, et les céphalines insolubles dans l'alcool et contenant de la colamine.

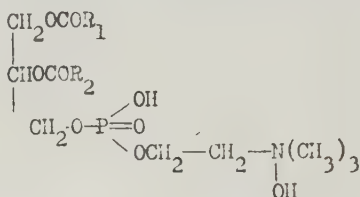
Actuellement, on en distingue plusieurs groupes:

- 1) phosphatidyl-cholines (lécithines),
- 2) phosphatidyl-sérines,
- 3) phosphatidyl-colamines,
- 4) phosphatidyl-inositides,
- 5) acétal-phosphatides,
- 6) divers.

Le radical phosphatidyl désigne l'ensemble constitué par les acides gras, le glycérol et l'acide phosphorique.

## Lécithines.

La structure des lécithines est aujourd'hui complètement élucidée grâce aux travaux de Baer et son école (25,26,27,28) Il s'agit d'une L- $\alpha$ -phosphatidyl-choline (I): l'acide  $\beta$ -glycéro-phosphorique trouvé parfois dans les hydrolysats constitue un artéfact formé pendant la migration du groupe phosphorylé au cours de l'hydrolyse, avec formation intermédiaire d'un orthoester cyclique selon le schéma A. Quant aux deux molécules d'acides gras estérifiant le glycérol, elles sont généralement différentes: l'une est saturée, l'autre insaturée. Hanahan (29) a démontré récemment que l'acide insaturé est fixé sur l'hydroxyle  $\alpha$  du glycérol.



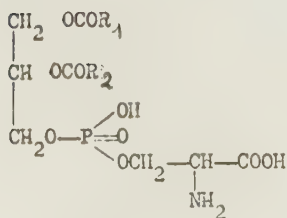
I

## Phosphatidyl-sérine et phosphatidyl-colamine.

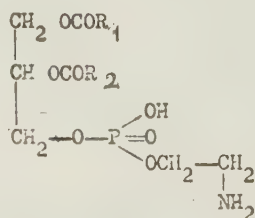
La L- $\alpha$ -phosphatidyl-sérine (II) a été découverte et sa structure déterminée par Folch et coll. (30). Elle constitue 40 à 70 % de la fraction céphalinique du cerveau.

Le même auteur isole également la phosphatidyl-colamine (III) (31) à l'état pur et confirme la formule attribuée par les travaux antérieurs à la fraction céphalinique brute. La phosphatidyl-colamine ne semble pas se former par décarboxylation de la phosphatidyl-sérine.

Baer et coll. réalisent la synthèse de la O-(L- $\alpha$ -glycérylphosphoryl) éthanolamine (32) et de la L- -(distéaryl) phosphatidyl-l-sérine (33).

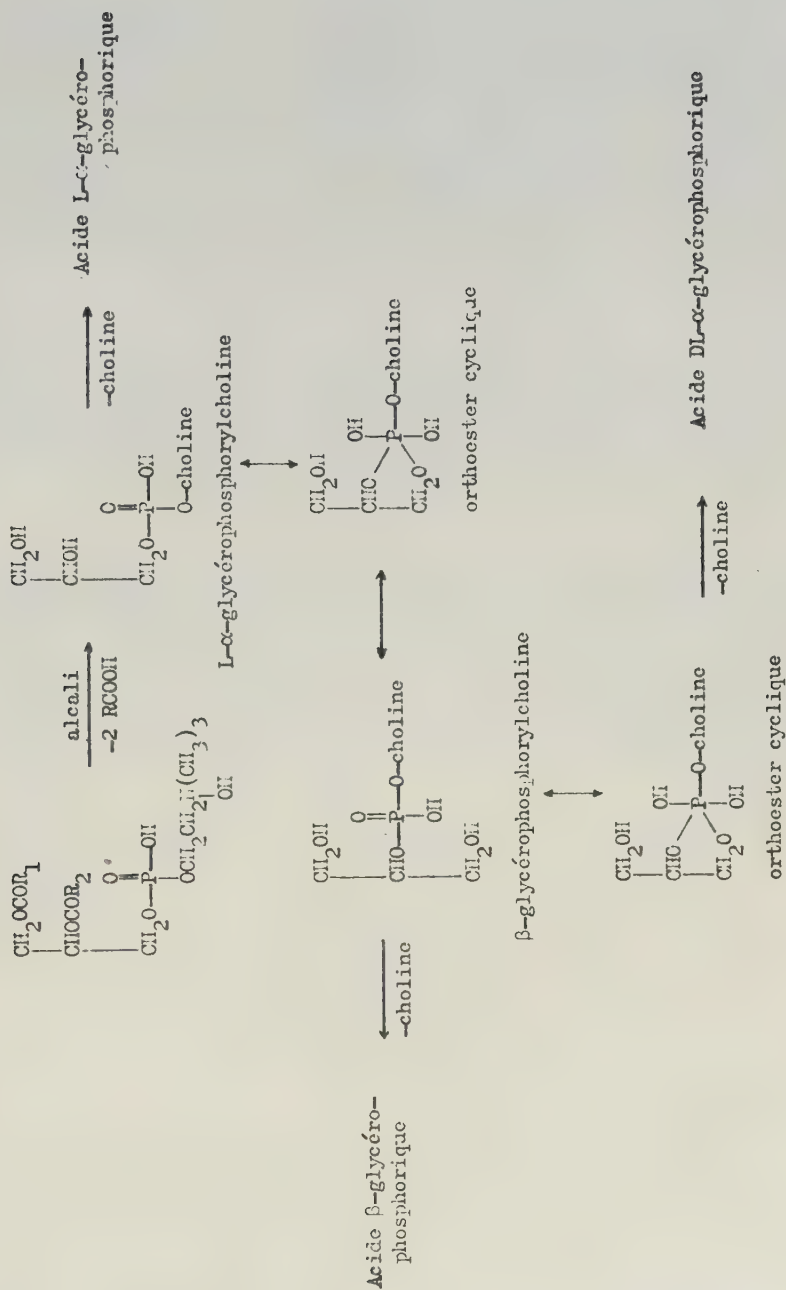


II



III

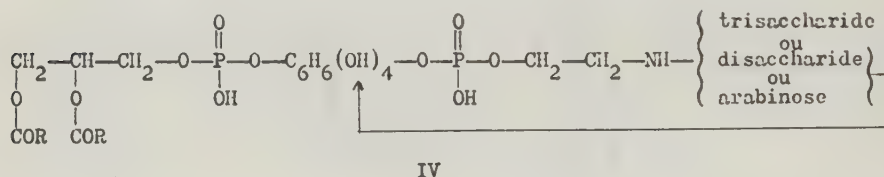
### Schéma A



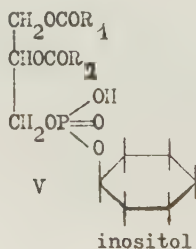
## Phosphatidyl-inositols ou phosphoinositides.

Dès 1930, Anderson (34) isole à partir de M.tuberculosis les phosphatides contenant l'inositol. Nous exposons dans le chapitre suivant, en détail, les travaux de cet auteur et de son école concernant la composition chimique des phospholipides du bacille tuberculeux.

En 1939, Klenk et Sakai (35) mettent en évidence la présence de l'inositol dans les hydrolysats de phospholipides de soja. Folch et Woolley (36) le trouvent dans les phosphatides du cerveau. Folch (37) a notamment isolé un diphosphoinositide d'une fraction de céphaline. Malkin et Poole signalent en 1953 (38) la présence dans l'huile d'arachide d'un phosphatide qui renferme de l'éthanolamine, de l'inositol et un trisaccharide composé de galactose et d'arabinose (IV).

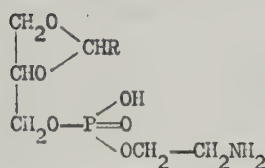


Faure et Morelec-Coulon (39,40) isolent du germe de blé (1953) et du muscle cardiaque du bœuf (1954) un phosphoglycéroinositide pour lequel, par analogie avec les autres phosphatides connus, elles proposent la structure (V). Hawthorne et coll. (41), McKibbin (42) décrivent un phosphoinositide dans le foie des mammifères, Rhodes et Lea (43) dans le jaune d'oeuf. Okuhara et coll. (44) établissent la structure d'un phosphatidyl-inositol obtenu à partir de germes de soja et Faure décrit le même phosphatide dans l'huile d'arachide (45).

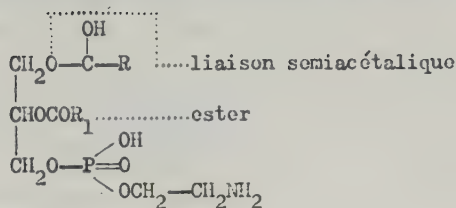


## Acétal-phosphatides.

A côté des phosphoinositides un autre groupe de phosphatides attire actuellement l'attention des chercheurs: les acétal-phosphatides ou plasmalogènes. Ils ont été isolés et étudiés par Feulgen et ses collaborateurs (46,47). La formule (VI) proposée par Feulgen et Bersin en 1939 (48) est aujourd'hui abandonnée; il ressort de travaux récents (49) que l'acétal-phosphatide contient une molécule d'aldéhyde gras, cette dernière liée par une liaison semiacétalique (VII).

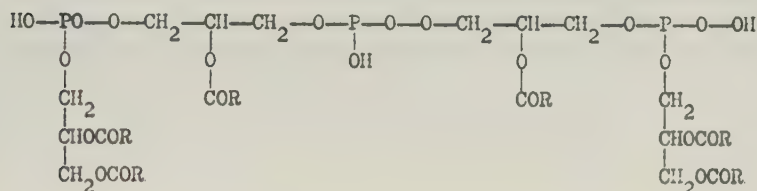


VI

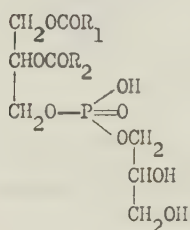


VII

Ajoutons encore à notre énumération les phosphatides à plusieurs molécules de glycérol comme la cardiolipine (VIII) (x) étudiée par Pangborn (50), par Faure (51) et par McFarlane (52,53), dont la structure est encore discutée, ainsi que le phosphatidyl-glycérol (IX) décrit récemment par Benson (54) dans les feuilles du tabac.



VIII



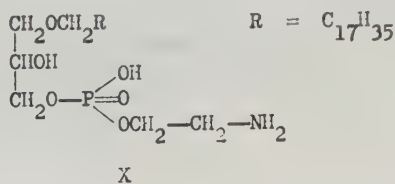
IX

### Divers.

Rhodes et Lea d'une part (55), Igarashi (56) d'autre part, isolent un nouveau glycérophosphatide contenant de la thréonine.

Carter et coll. (57) découvrent tout dernièrement dans le jaune

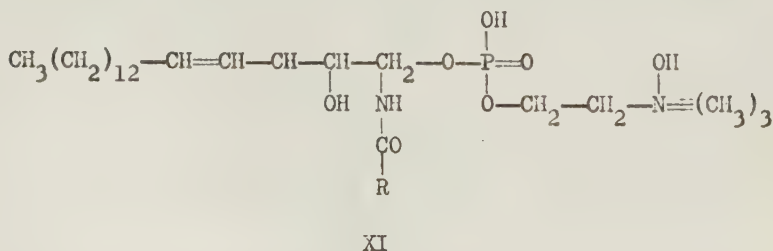
d'oeuf un phospholipide qui renferme de l'éthanolamine et dont la structure (\*) est différente de celle d'une phosphatidyl-éthanolamine.



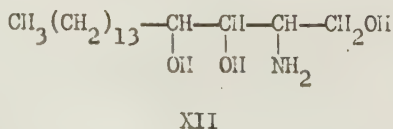
Collins (58) signale la présence, dans le cerveau de mouton, d'un phosphatide complexe de poids moléculaire 2030, renfermant deux molécules d'acides gras, deux molécules de phosphate de glycérol, une molécule de colamine, de choline, de sucre et d'un alcool gras; en plus ce phospholipide contient deux substances azotées non identifiées.

## 2. Sphingophosphatides.

La sphingomyéline a été isolée du cerveau par Thudichum en 1901 (59). Elle contient la sphingosine, un diol aminé  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{O}_2\text{N}$  dont la structure a été déterminée par Carter, Glick, Norris et Phillips (60). Quant à la sphingomyéline, sa formule détaillée (XI) a été établie par Marinetti et coll. (61,62). La sphingosine est amidifiée sur le  $\text{NH}_2$  par un acide gras et porte sur le groupe alcool primaire la phosphorylcholine. L'acide gras est presque exclusivement l'acide lignocérique.

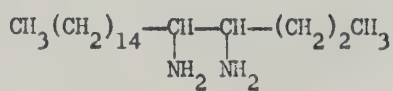


En 1954 Carter trouve dans les phosphatides d'huile de maïs et de soja l'hydroxysphingosine (XII) (63).



(\*) Pangborn trouve cinq acides linoléiques et un acide oléique.

Dans un phosphatide bactérien, Niemann signale la présence d'une base analogue à la sphingosine: la nécrosamine (XIII) (64).



XIII



## ETUDE CHIMIQUE DES PHOSPHOLIPIDES DE M. TUBERCULOSIS.

### Travaux antérieurs.

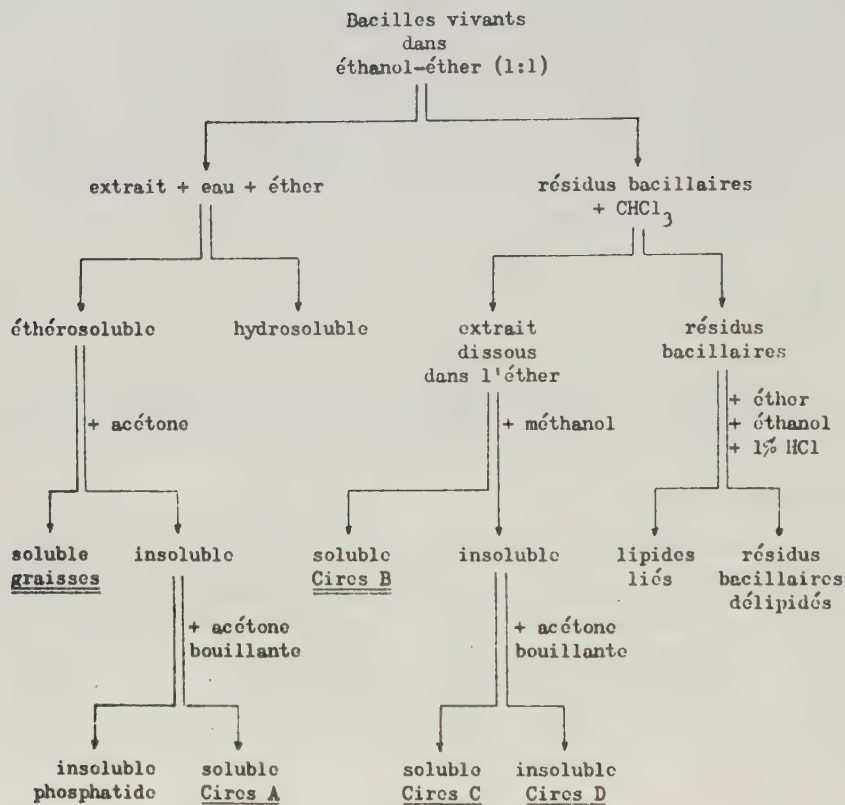
Les premiers auteurs (Hammerschlag (1), Kressling (65), Baudran (66), Auclair et Paris (67), étudiant les lipides de M. tuberculosis, désignent les phosphatides bacillaires, par analogie avec ceux qui sont extraits des plantes et animaux, sous le nom des lécithines. Sakae Tamura en 1913 (68) démontre que le phospholipide bactérien est différent et Frouin et Agulhon (69) obtiennent par saponification et hydrolyse acide les acides gras, le glycérol, une base azotée et le glucose. Ces premières recherches ont été effectuées sur les bacilles tués par la chaleur et extraits par les solvants bouillants sans précaution contre l'oxydation.

C'est seulement Anderson et son école (3,21,22,23), en entreprenant l'étude systématique des lipides bactériens, qui nous donnent des renseignements plus précis sur la constitution des phosphatides. Ils utilisent différentes souches humaines (23, 70 à 74), bovines (73,75) et aviaires (73,76), cultivées soit sur le milieu de Sauton (77), soit sur celui de Long (78); pour éviter la formation d'artéfacts, ces auteurs travaillent avec les bacilles vivants sous atmosphère de gaz carbonique.

L'épuisement répété des bacilles par le mélange alcool-éther (1:1), permet d'obtenir un premier extrait, fractionné ensuite par des précipitations de sa solution étherée, soit par le méthanol, soit par l'acétone. Asselineau et Lederer (79) ont complété ce schéma d'extraction en utilisant l'acétone bouillante afin de séparer les cires A et le phosphatide ainsi que les cires C et D. La fraction insoluble dans l'alcool-éther (1:1) est ensuite séparée en trois parties: cires B, C et D (tableau 1).

Le phospholipide de M. tuberculosis est décrit par Anderson comme étant un composé amorphe, légèrement hygroscopique, facilement soluble dans l'éther, le chloroforme et le benzène, pratiquement insoluble dans l'acétone, l'alcool ou l'acétate d'éthyle. Il se disperse dans l'eau en donnant une solution opalescente, colloïdale, d'où il est impossible de l'extraire quantitativement par l'éther.

Tableau 1



Comme nous l'avons déjà mentionné, au point de vue chimique la constitution des phospholipides bacillaires diffère de celle des phosphatides végétaux ou animaux. D'après les résultats d'Anderson (3), leur teneur en phosphore varie entre 1,8 et 3,7 % selon la souche étudiée) et ils contiennent très peu d'azote (tableaux 2 et 3).

Tableau 2

Composition et point de fusion des phosphatides de Mycobactéries.

| Souche          | H-37 humaine | Bovine | Aviaire | Timothée | Lèpre |
|-----------------|--------------|--------|---------|----------|-------|
| P %             | 2,30         | 1,87   | 2,18    | 2,80     | 1,75  |
| N %             | 0,36         | 1      | 0,48    | 0,22     | trace |
| Point de fusion | 210°         | 208°   | 210°    | 190°     | 231°  |
| Ethérosoluble % | 66-67        | 57-58  | 55-56   | 60       | 62,2  |
| Hydrosoluble %  | 33-34        | 43-44  | 46-47   | 40       | 38    |

Tableau 3

Teneur en phosphore et azote des phosphatides provenant  
de cinq différentes souches humaines cultivées sur milieu de Long.

| Souche | H-37 | A-10 | A-12 | A-13 | A-14 |
|--------|------|------|------|------|------|
| P %    | 2,95 | 3,44 | 3,30 | 3,76 | 3,33 |
| N %    | 0,44 | 0,33 | 0,21 | 0,56 | 0,53 |

Chargaff, en étudiant les phosphatides de BCG, de M. smegmatis et du bacille de la tortue, donne les résultats suivants (80):

Tableau 4

Teneur en phosphore et azote des phosphatides de Mycobactéries.

| Souche | BCG  | M. smegmatis | M. de la tortue |
|--------|------|--------------|-----------------|
| P %    | 1,58 | 3,16         | 2,36            |
| N %    | 0,40 | 0,39         | 0,39            |

Signalons que d'autres chercheurs ont obtenu des préparations phosphatidiques totalement dépourvues d'azote (Boissevain et Ryder (81), K. Bloch (82,83), Macheboeuf et Faure (84), Pangborn (85)).

Il résulte des données citées plus haut que les phospholipides des Mycobactéries contiennent beaucoup moins d'azote et moins de phosphore que les autres phospholipides connus.

En saponifiant les phosphatides étudiés, Anderson et ses collaborateurs (3) obtiennent environ 60 % d'acides gras, mélange d'acides saturés solides (palmitique et stéarique) et liquides (acide phtiolique \*) avec des acides insaturés (palmitoléique, oléique). Les acides gras sont liés à des polyosides phosphorylés contenant du glycérol, de l'inositol, du mannose, accompagnés dans certains cas d'un autre hexose réducteur, non identifié. Après la déphosphorylation du polyoside, Anderson, Lothrop et Creighton (74) ont obtenu un triholoside, appelé manninositose qui peut être scindé en 2 molécules de mannose et une molécule d'inositol. Les mêmes auteurs décrivent également une fraction contenant l'acide mannose-glycérol-diphosphorique (74). De Suto Nagy et Anderson, en

---

\* Deux groupes de chercheurs (Polgar et coll. (86,86bis), Cason et coll. (87,88), ayant étudié simultanément "l'acide phtiolique" d'Anderson, ont démontré que cette fraction contient plusieurs constituants parmi lesquels deux acides sont pondéralement les plus importants: acides C<sub>27</sub> et C<sub>29</sub> phtiénoïques (appelés également mycolipéniques). Ils sont  $\alpha, \beta$ -éthyléniques et comportent trois méthyles en 2, 4 et 6.

travaillant sur les phospholipides de bacilles tuberculeux résiduaire de la fabrication de tuberculine, ont isolé des acides inosito-monophosphorique et inosito-diphosphorique (23). Ces résultats semblent confirmer les suggestions de Macheboeuf et Faure (84) d'après lesquelles les phospholipides du M.tuberculosis sont "des acides glycéro-phosphoriques liés par estérification, d'une part à des acides gras et d'autre part à des polyalcools non azotés".

Barbier et Lederer (89), en étudiant les phosphatides de Mycobacterium phlei (souche cultivée à l'Institut Pasteur à Paris, extraite selon Anderson), signalent la présence de l'hydroxylysine. Michel et Lederer (90) trouvent la colamine dans les phosphatides de M.marianum.

Toutefois, l'enchaînement de différents constituants des phospholipides de Mycobactéries n'a pas encore été étudié. C'est surtout ce problème que nous nous sommes proposés de résoudre. En même temps, ayant en mains différentes souches de Mycobactéries, nous avons pu établir et comparer la composition de leurs phosphatides.

Les méthodes de l'investigation de la structure des phospholipides que nous avons employées reposent essentiellement sur l'hydrolyse ménagée de ceux-ci de façon à scinder la molécule en fragments plus ou moins grands dont nous analysons les constituants ainsi que leur mode d'enchaînement.

## PARTIE THEORIQUE

### CHAPITRE 1

#### LES PHOSPHOLIPIDES DE MYCOBACTERIUM PHLEI

##### Purification des phospholipides.

Le phosphatide étudié provenait d'une souche de Mycobacterium phlei utilisée par Francis, Macturk, Madinaveitia et Snow pour la production de mycobactine (facteur de croissance de Mycobacterium Johnei) (91)\*.

De ce fait cette préparation n'était pas obtenue selon le schéma d'extraction d'Anderson (tabl.1, p. ); les bactéries étaient traitées successivement par le méthanol froid et chaud, puis le résidu dissous dans l'éthanol et précipité par l'acétate de cuivre, ensuite fractionné par le chloroforme et purifié par chromatographie et précipitation dans l'éther. La fraction insoluble dans le méthanol et l'éthanol chaud contenait de très faibles quantités de phosphore. Plusieurs extractions par l'acétone bouillante, suivies de dissolution du résidu dans l'éther et précipitation par l'acétone, nous ont permis d'obtenir une substance amorphe, jaunâtre, laquelle, après purification par filtration de sa solution chloroformique sur poudre de cellulose d'après Rhodes et Lea (92), se présente sous forme d'une poudre presque incolore, F.219-222°, contenant 1,6 % de phosphore et 1,58 % d'azote.

##### Composition des phospholipides.

La saponification alcaline ménagée de ce phosphatide (d'après Anderson et coll. (74) donne 56 p. 100 d'acides gras qui semblent être composés essentiellement d'acide palmitique, et un hydrosoluble contenant du phosphore, du magnésium, du glycérol, de l'inositol et du D-mannose (93).

---

\* Nous remercions le Dr. G.A.Snow (Manchester) pour les lipides de cette souche.

### Identification des acides gras.

Le poids moléculaire moyen des acides gras est de 257 (obtenu par titrage alcalimétrique). Nous avons préparé à partir de la fraction acide, par action du diazométhane, l'ester méthylique qui, après distillation, fond à 27-29° et ne présente pas d'abaissement du point de fusion en mélange avec un échantillon authentique de palmitate de méthyle. Sa composition centésimale s'accorde bien avec la formule  $C_{17}H_{34}O_2$ . Il a été également relativement facile d'isoler l'acide palmitique à peu près pur F.60-62°, par saponification de l'ester méthylique suivie de distillation sous vide poussé de l'acide régénéré.

### Analyse de la fraction hydrosoluble.

Quant aux constituants hydrosolubles, nous avons dosé le glycérol selon Denigès (94) et identifié l'inositol par la réaction de Scherer (95). L'inositol a été également dosé par la méthode microbiologique, basée sur le fait que cet hexitol constitue un facteur de croissance indispensable pour le mutant "Inositolless" de Neurospora crassa \*. Après avoir soumis la fraction hydrosoluble à une hydrolyse acide, nous avons pu identifier le D-mannose par chromatographie sur papier et par son isolement sous forme de phénylhydrazone, F.190-191°,  $(\alpha)_D^{+28}$  (pas de dépression du point de fusion en mélange avec la phénylhydrazone du mannose authentique). Anderson et ses collaborateurs avaient déjà isolé le même dérivé à partir des phosphatides de Mycobactéries. Ajoutons que nous ne trouvons qu'un seul sucre dans le phosphatide étudié.

### Identification des acides aminés.

Afin d'identifier les acides aminés présents dans l'hydrolysat chlorhydrique du phosphatide de M.phlei, nous avons eu recours à l'électrophorèse et à la chromatographie sur papier. Ces deux méthodes nous ont permis de déceler deux acides aminés dicarboxyliques, les acides glutamique et aspartique, trois acides aminés neutres: l'alanine, la proline et le glycocole, et un acide aminé basique: l'ornithine. Nous avons isolé cette dernière par chromatographie sur une colonne de Dowex-50 en éluant par l'ammoniaque diluée, et cristallisé à l'état de dipicrate, F.205-209° (le point de fusion ne présente pas d'abaissement en mélange avec le dipicrate d'ornithine authentique). L'ornithine isolée du phosphatide a été également identifiée par la réaction de Chinard (96). Les courbes d'absorption de la solution colorée provenant de l'action de la ninhydrine sur l'ornithine de M.phlei et sur l'ornithine témoin sont pratiquement identiques. (fig.1).

---

\* Nous remercions vivement MM. les professeurs P.Fleury, P.Malangeau et M. R.Perlès pour ces dosages.

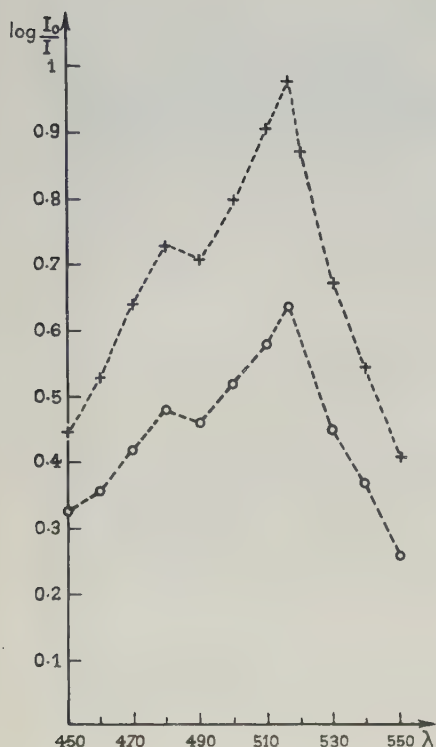


Figure 1. Réaction de Chinard sur l'ornithine.

x Solution de 0,0054 g/l de dichlorhydrate d'ornithine

o Solution de 0,0023 g/l d'ornithine isolée de phospholipides de M. phlei.

Dans des travaux simultanés, Gendre et Lederer (97) signalent la présence d'ornithine dans les phosphatides de M. avium.

#### Inhomogénéité du phospholipide étudié.

Avant de pousser plus loin l'étude chimique de cette préparation phosphatidique, nous avons voulu vérifier son homogénéité.

Nous avons chromatographié le phosphatide sur une colonne d'acide silicique mélangé de célite (2:1) avec élution par un gradient de méthanol dans le chloroforme et avons obtenu cinq fractions nettement distinctes:

- une première fraction, F.62-70°, dépourvue de phosphore,
- trois fractions: A fondant à 212-215°,  
B fondant à 205-207°  
et C fondant à 215-219°;
- une cinquième fraction, D, ne s'éluant qu'assez difficilement et irrégulièrement, F.198-200°.

Le tableau 5 indique les résultats des analyses effectuées sur ces fractions.

Tableau 5

| Fraction | P<br>% | C<br>% | H<br>% | N<br>% | Cendres<br>( )<br>% | Ac. gras<br>% | Sucres<br>% | Glycérol<br>% | Inositol<br>% | Acides<br>aminés<br>% | Total<br>% |
|----------|--------|--------|--------|--------|---------------------|---------------|-------------|---------------|---------------|-----------------------|------------|
| A        | 1,4    | 59,21  | 9,84   | 0,5    | 8,4                 | 68            | 19,5        | 4,8           | 5             | 0,68                  | 104,3      |
| B        | 1,8    | 57,55  | 9,29   | 0,5    | 9,5                 | 60            | 22,7        | 5,2           | 4             | 0,85                  | 100,3      |
| C        | 1,8    | 57,12  | 9,09   | 0,5    | 8,9                 | 58            | 23,2        | 5,3           | 2             | 0,9                   | 96,3       |
| D        | 3,9    | 53,03  | 8,59   | 2,8    | 16,5                | 31            | 35          | 7,5           | 6             | 2,5                   | 96,5       |

Poids des cendres obtenues au cours de l'analyse élémentaire de carbone et hydrogène.

On voit que le pourcentage de carbone baisse et que celui d'azote, de phosphore et des sucres augmente dans la série des éluats. L'analyse des acides aminés des fractions A, B, C et D a montré que chacune contient les mêmes acides déjà décelés dans le phosphatide brut avant la chromatographie mais dans des proportions différentes. Tous les autres constituants étant identiques, la seule différence observée est d'ordre quantitatif.

Nous avons vérifié que les fractions A et B par exemple se comportent bien comme des substances distinctes; chacune, chromatographiée de nouveau sur une colonne d'acide silicique-célite, donne un seul pic d'éluion se trouvant à un endroit bien défini tandis que le mélange de deux fractions donne deux pics d'éluion.

A notre regret, nous n'avons pas pu étudier ces fractions d'une façon plus détaillée faute de matière première.

#### Discussion des résultats.

Nous avons trouvé les mêmes constituants hydrosolubles dans les préparations phosphatidiques provenant du bacille de la fléole, qu'Anderson dans les souches humaines et bovines. Les acides gras identifiés par nous ont par contre une structure très simple; dans le cas de M.phlei il s'agit uniquement d'acide palmitique. En ce qui concerne les acides aminés, le fait qu'on les décèle après avoir filtré les phosphatides sur une colonne de cellulose, permet de supposer qu'ils sont liés aux phospholipides.

D'autres auteurs ont signalé dernièrement la présence d'acides aminés dans les phosphatides bacillaires. Ainsi, Melik a trouvé l'acide aspartique, la sérine, le glyocolle, l'alanine, la lysine et l'arginine dans un phosphatide de Salmonella ballerup (98) et dans celui de Salmonella paratyphi, l'acide glutamique, la lysine, l'arginine et un acide non identifié (99). Le même auteur signale dans les phosphatides du bacille

diphtérique la présence des acides aspartique et glutamique, de la sérine, de l'alanine, de la tyrosine, de la valine, de la leucine, de l'arginine et du glyocolle (100). Ikawa, Koepfli, Mudd et Niemann (64) identifient dans un phospholipide de E.coli l'acide aspartique, et Westphal et Lüderitz (101), les acides aspartique et glutamique dans une préparation phosphatidique différente provenant également de E.coli.



## CHAPITRE II

### CHIMIE DES PHOSPHOLIPIDES D'UNE SOUCHE H-37 Rv STREPTOMYCINO-RESISTANTE

Dans ce chapitre nous abordons l'étude des phospholipides d'une souche humaine virulente H-37 Rv streptomycino-résistante, aimablement fournie par le Dr. Bretey, chef de service à l'Institut Pasteur à Paris.

Ces bacilles ont été cultivés pendant quatre semaines sur le milieu de Sauton et extraits selon le schéma indiqué dans le tableau I (p. 22).

Le phosphatide brut, qui constitue environ 1,5 % du poids sec des bactéries, a été dissous dans le chloroforme et filtré sur une colonne de cellulose, ensuite chromatographiée sur acide silicique-célite (2:1). Ainsi purifié il était totalement exempt d'azote et semblait d'après les analyses être un mélange de phosphatidyl-D-mannose et de phosphatidyl-inositol.

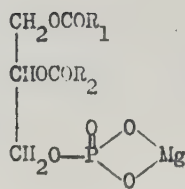
En poursuivant l'examen de cette fraction F.182-183°, nous nous sommes aperçus qu'elle pouvait être séparée par précipitation de sa solution chloroformique au moyen de méthanol en deux parties distinctes qui ne correspondent pas à celles mentionnées plus haut:

- 1) une fraction soluble dans le chloroforme-méthanol (1:1) qui est constituée par le sel de magnésium d'un acide phosphatidique I.
- 2) une fraction insoluble dans ce mélange de solvants qui est un phosphatidyl-inosito-dimannoside (III), également salifié par du magnésium, calcium ou sodium.

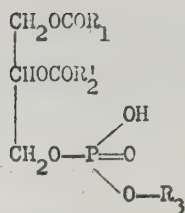
Signalons que les acides phosphatidiques ont été considérés comme unique constituant des phosphatides de M. tuberculosis par K. Bloch (82). Depuis, leur présence dans les bacilles a été mentionnée par Macheboeuf et Faure (84), ainsi que récemment par Čmelik (100).

#### 1. ACIDE PHOSPHATIDIQUE.

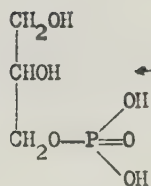
La fraction phosphatidique soluble dans le chloroforme-méthanol (1:1) constitue environ 50 % de la substance F.182-183°. Nous l'avons purifiée par chromatographie sur acide silicique-célite (5:4) et obtenons 90 % de la quantité de départ sous forme d'une poudre amorphe légèrement jaunâtre, fondant à 161-164° et contenant 4,2 % de phosphore et 12,5 % de glycérol (dosé selon Denigès (94)). Ce produit est le sel de magnésium d'un acide phosphatidique. A côté du magnésium, de fai-



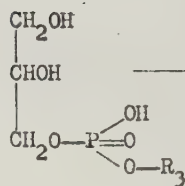
I



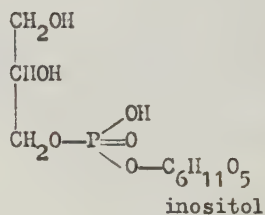
III



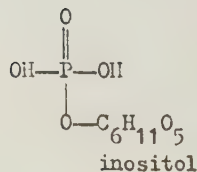
II



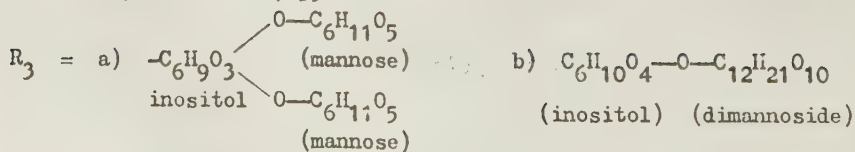
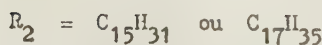
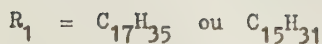
IV



V



VI



bles quantités de calcium et de sodium ont été décelées par spectrographie\* dans les cendres du produit F.161-164°. En accord avec la présence de magnésium, l'acide phosphatidique est neutre.

La chromatographie sur papier de la substance F.161-164° selon Böhm et coll. (102) a donné une seule tache,  $R_f = 0,85$ .

En traitant le sel de magnésium F.161-164° avec de l'acide chlorhydrique dilué, on obtient l'acide phosphatidique libre qui contient 4,35 % de phosphore et fond à 48-51°.

### Produits d'hydrolyse.

Une hydrolyse alcaline ménagée scinde le produit F.161-164° en un mélange d'acide gras et une partie hydrosoluble.

Les acides gras représentent 74 % de la substance; ils fondent à 58-61° et ont, d'après le titrage alcalimétrique, un poids moléculaire moyen de 272. Il y a deux molécules d'acide gras par atome de phosphore. L'absence d'insaturation (indice d'iode nul) et l'analyse élémentaire de l'ester méthylique F.26-29° indiquent qu'il s'agit d'un mélange, à parties à peu près égales, d'acides palmitique et stéarique.

La partie hydrosoluble a été identifiée à l'acide  $\alpha$ -glycérophosphorique (II) par chromatographie sur papier et par oxydation périodique de la façon suivante: la révélation du chromatogramme au réactif molybdique fait apparaître une tache au niveau de l'acide glycérophosphorique. Cette même tache apparaît par révélation au réactif périodique selon Metzner et Mitchell (103) ce qui indique la présence de l'acide -glycérophosphorique, l'isomère  $\beta$  ne réagissant pas avec le périodate.

Nous avons essayé d'isoler l'acide  $\alpha$ -glycérophosphorique à l'état de sel de baryum par précipitation au moyen d'alcool. Nous avons obtenu une fraction dont l'analyse élémentaire concorde avec la formule  $C_3H_7O_6PBa$ ,  $H_2O$ . Selon Heilbron (104) la cristallisation de glycéro-phosphate de baryum avec une molécule d'eau est caractéristique de l'isomère

. Nous avons donc affaire à un mélange d'acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -glycérophosphoriques, mais, comme nous l'avons dit plus haut, selon les travaux de Baer (25,105), l'acide  $\beta$ -glycérophosphorique trouvé dans les produits de saponification des phosphatides constitue un artéfact formé au cours de l'hydrolyse alcaline.

L'acide glycérophosphorique provenant de l'acide phosphatidique incubé avec la polidase S, enzyme constitué par un mélange de phosphatases, est scindé en glycérol et acide phosphorique, identifiés par chromatographie sur papier.

L'ensemble des résultats nous conduit à la formule I pour la substance F.161-164°; elle correspond à la formule brute  $C_{37}H_{71}O_8PMg$ ; les analyses élémentaires de la substance 161-164° sont en accord avec cette formule.

---

\* Nous remercions M. G. Michel (Lyon) pour cette analyse.

## 2. PHOSPHATIDYL-INOSITO-DI-D-MANNOSIDE.

La fraction phosphatidique insoluble dans le chloroforme-méthanol (1:1) (environ 50 % de la substance 182-183° décrite précédemment) fond à 206-208°; comme le montre la chromatographie sur papier de la partie hydrosoluble obtenue après saponification alcaline douce, ce phosphatide n'est pas encore pur. Il est accompagné d'environ 15 à 18 % d'acide phosphatidique. Par un traitement avec du chloroforme-méthanol (3:2) nous avons réussi à diminuer la teneur en acide phosphatidique jusqu'à 5 %. Nous déterminons sa teneur de la façon suivante: le phosphatide est hydrolysé en milieu alcalin et la partie hydrosoluble est ensuite chromatographiée sur papier. On obtient deux taches contenant du phosphore: l'une,  $R_f = 0,82$ , provenant de l'acide phosphatidique (correspondant à l'acide glycérophosphorique), l'autre,  $R_f = 0,62$ , provenant du phosphatidyl-inosito-dimannoside. Le dosage du phosphore dans chacune des taches après élution permet une évaluation des proportions d'acide phosphatidique dans le phosphatide. Les chiffres ainsi obtenus sont des chiffres maxima, car il n'est pas exclu que de petites quantités d'acide glycéro-phosphorique se forment au cours de la saponification du phosphatide ou même pendant la chromatographie.

La préparation phosphatidique ainsi obtenue ( $\alpha$ )<sub>D</sub> = + 34°, fond à 209-210°.

Etant donné la faible quantité de substance disponible, il ne nous a pas été possible de pousser sa purification plus loin.

Il est d'ailleurs très difficile de juger de la pureté de phosphatide étant donné son instabilité. Il s'hydrolyse très facilement au cours de différents traitements. La partie hydrosoluble obtenue après saponification alcaline est également très instable; quand on évapore sa solution aqueuse sous vide à 40°, on observe la formation d'acide phosphorique libre et d'acide glycérophosphorique. L'instabilité des acides phosphatidiques et des inosito-phosphatides a d'ailleurs été remarquée précédemment par Olley (106) et Faure et Morelec-Coulon (communication verbale).

Le phosphatide F. 209-210° contient 2,45 % de phosphore, 7,6 % de glycérol, 13,1 % d'inositol et 27,1 % de mannose. La théorie pour la formule  $(C_{55}H_{102}O_{23}P)_2Mg$  correspondant à un sel de magnésium de deux molécules du phosphatide III est: 2,6 % de phosphore, 7,8 % de glycérol, 15,3 % d'inositol et 30,7 % de mannose. Ses cendres, comme celles de l'acide phosphatidique étudié plus haut, contiennent surtout du magnésium, mais aussi un peu de calcium et de sodium, mis en évidence par spectrographie. En accord avec la présence de ces cations, le phosphatidyl-inosito-dimannoside s'avère pratiquement neutre.

Les acides gras obtenus par saponification alcaline du phosphatide F 209-210° constituent 44 % de son poids; ils fondent à 56-60°, sont saturés et sont un mélange à parties égales d'acide palmitique et stéarique.

La chromatographie sur papier du mélange d'acides nous a permis d'identifier ces deux acides. Nous avons d'abord essayé de séparer les acides étudiés sur papier non traité préalablement, mais cette méthode

ne nous a pas donné de résultats satisfaisants. Par contre, la chromatographie sur papier imprégné d'huile de paraffine (Nujol) selon Ceccaldi et coll. (107) suivie de révélation par la Rhodamine B, fait apparaître deux taches nettement distinctes que nous avons pu identifier aux acides palmitique et stéarique. L'analyse centésimale de la fraction acide concorde avec les résultats obtenus.

Il est remarquable que, contrairement à l'opinion courante (voir les travaux d'Anderson (3) et également de Fray et Polgar (108), les acides gras de ces phosphatides (au moins dans le cas de H-37 Rv streptomycino-résistante et de Mycobactérium phlei, voir p. 25) sont saturés et de structure très simple. Il semble bien que les acides insaturés et ramifiés observés antérieurement provenaient de la présence de cires A dans la fraction phosphatidique étudiée. Nous avons vérifié que les cires A de H-37 Rv s. r. contiennent effectivement des acides  $\alpha, \beta$ -insaturés : elles présentent un maximum d'absorption dans l'ultra-violet vers 220 m $\mu$ .

La partie hydrosoluble obtenue par saponification alcaline du phosphatide donne, comme nous l'avons déjà mentionné, deux taches phosphorées sur papier : la principale de  $R_f = 0,5$ , l'autre  $R_f = 0,79$ ; cette dernière est identique à l'acide glycérophosphorique II (identifié comme ci-dessus); sa teneur en phosphore ne constitue que 3 % de celui de la substance principale de  $R_f = 0,5$ .

Cette partie hydrosoluble principale IV contient, pour une molécule de phosphore, une molécule de glycérol et d'inositol et deux molécules de D-mannose.

Le dosage du glycérol a été effectué selon Denigès (94). La méthode est basée sur l'oxydation du glycérol en dioxyacétone, laquelle, sous l'action de l'acide sulfurique concentré, se transforme en méthylglyoxal : ce dernier donne avec la codéine une coloration dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en glycérol.

Le D-mannose a été identifié après hydrolyse acide par l'isolement de D-mannose phénylhydrazone, F. 193-194°; ( $\alpha$ )<sub>D</sub> = +28,2°, selon Anderson et coll. (74); il n'y a pas de dépression de point de fusion en mélange avec la substance authentique. La chromatographie sur papier dans plusieurs solvants différents permet de vérifier qu'il n'y a pas d'autres sucres. Le dosage du D-mannose a été effectué à l'anthrone selon Johanson (109).

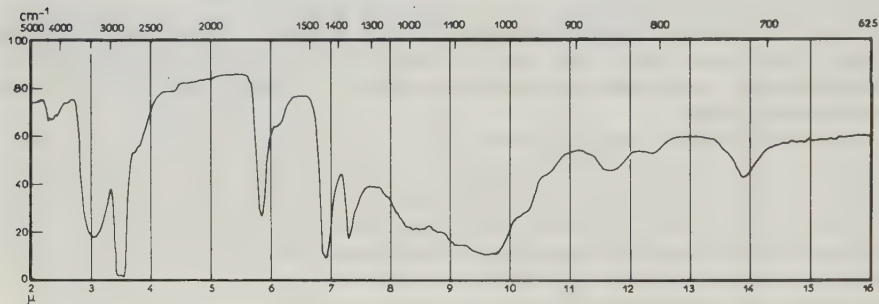
L'inositol a été dosé par oxydation périodique après chromatographie sur papier selon Böhm et Richarz (110); un dosage microbiologique sur Neurospora crassa "Inositolless" a montré qu'il s'agit bien de méso-inositol.

Nous avons également pu isoler l'inositol cristallisé à partir d'un hydrolysât acide du phosphatide entier, neutralisé et désionisé par les échangeurs d'ions, Amberlite IR 4B et IRC 50 (111). Le méso-inositol obtenu fond à 221-222° et ne donne pas de dépression de point de fusion avec un échantillon authentique.

Une hydrolyse acide ménagée permet de scinder la fraction hydrosoluble (IV) en mannose et glycérophosphate d'inositol (V) accompagné toutefois d'acide glycérophosphorique (II) et d'inositophosphate (VI). Le

glycérophosphate d'inositol a été identifié par chromatographie sur papier; on obtient une tache de  $R_f = 0,69$  qui contient du phosphore, du glycérol et de l'inositol.

Etant donné que ni le phosphatide intact, ni l'hydrosoluble (IV) ne sont réducteurs, les deux molécules de mannose sont fixées par des liaisons glycosidiques. Le phosphatide correspond ainsi à la formule (III). Son analyse élémentaire est en accord avec  $(C_{55}H_{102}O_{23}P)_2Mg$  (sel de Magnésium du phosphatidyl-inosito-dimannoside). Son spectre IR montre la présence d'une forte bande hydroxyle à  $3,300\text{ cm}^{-1}$  et d'une bande ester à  $1710\text{ cm}^{-1}$  (fig. 2).



Nous avons déphosphorylé l'hydrosoluble (IV) par chauffage avec l'ammoniaque d'après Anderson et coll. (74) et désionisé la solution par l'Amberlite MB 3. L'inosito-dimannoside ainsi obtenu,  $(\alpha)_D^{+76,7^\circ}$ , est incolore, amorphe, n'a pas de point de fusion défini et se décompose vers  $260^\circ$ . Il contient 68 % de sucres réducteurs (dosage à l'anthrone (109)) et 34,2 % d'inositol (dosage selon Böhm et Richarz (110)).

En le traitant par anhydride acétique dans la pyridine, nous obtenons un acétate qui, après purification par chromatographie sur silicate de magnésium-célite (2:1), se présente sous forme d'une poudre microcristalline, incolore,  $F. 136-138^\circ$ ,  $(\alpha)_D^{+52^\circ}$ . Son analyse élémentaire concorde avec la formule  $C_{42}H_{56}O_{28}$  d'un dodécaacétate d'un dimannosido-inositol. Anderson et coll. (74) ont préparé à partir d'un phosphatide de la souche humaine H-37 \* un acétate analogue pour lequel ils indiquent les constantes physiques suivantes:  $F. 112^\circ$ ,  $(\alpha)_D^{+48,7^\circ}$ .

#### Essais de méthylation.

Afin de déterminer le mode d'enchaînement des constituants du phosphatidyl-inosito-dimannoside et de choisir entre les deux possibilités IIIa ou IIIb, nous nous sommes proposés de méthyliser le phosphatide et d'étudier les produits d'hydrolyse de la substance méthylée.

- La souche de bacilles humains étudiée par Anderson et désignée par H-37 a subi au cours du temps une dissociation qui a donné naissance à deux souches: H-37 Ra, avirulente, et H-37 Rv, virulente.

Nous avons effectué plusieurs essais de méthylation. Différentes méthodes - méthylation dans le diméthylformamide selon Kuhn (112), dans le chloroforme selon Okuhara et Nukayama (44) - ont été appliquées mais aucune n'a donné de résultats entièrement satisfaisants. L'examen des spectres I.R. de la substance méthylée révèle l'existence d'une bande hydroxyle.

Le manque du phosphatidyl-inosito-dimannoside de la souche H-37 Rv streptomycino-résistante nous a obligée d'interrompre cette étude que nous avons reprise sur la souche B.C.G. (Chapitre suivant).

### Conclusion.

Le phosphatide de la souche H-37 Rv s.r. est constitué par un mélange à parties à peu près égales des sels de magnésium (calcium ou sodium), de l'acide phosphatidique (I) et du phosphatidyl-inosito-dimannoside (III) (113).

Les travaux d'Anderson laissaient entrevoir l'existence du phosphatide correspondant à la formule (III) mais il n'avait jamais été isolé comme tel.

Quant à l'acide phosphatidique, il est possible qu'il soit formé à partir du phosphatidyl-inosito-dimannoside par hydrolyse enzymatique ou même spontanée au cours de l'extraction étant donné la fragilité des phosphatides non azotés.

Les acides gras sont constitués par un mélange d'acides palmitique et stéarique. Nous n'avons pas pu mettre en évidence dans les phosphatides les acides éthyléniques et ramifiés signalés par Anderson.



## CHAPITRE III

### LES PHOSPHOLIPIDES DU BACILLE CALMETTE-GUERIN (BCG).

Nous avons pu isoler le phosphatidyl-inosito-dimannoside à partir de la souche bovine atténuée du bacille Calmette-Guérin. Nous avons travaillé avec les souches cultivées sur deux milieux différents: milieu de Sauton d'une part et milieu de culture peptoné et glycérimé d'autre part. Les résultats obtenus diffèrent suivant le lot examiné.

Ajoutons aussi qu'étant donné la faible teneur des Mycobactéries en phospholipides, nous étions obligés, aussi bien dans le cas de la souche H-37 Rv s.r. que dans celui de la souche BCG, d'analyser plusieurs échantillons différents de la même souche.

#### A. Etude des phospholipides d'une souche de BCG cultivée sur milieu de Sauton.

##### Nouvelle méthode d'extraction.

En admettant que l'acide phosphatidique isolé de la souche H-37 Rv streptomycino-résistante provient de la dégradation du phosphatidyl-inosito-dimannoside au cours de l'extraction, nous avons cherché une méthode permettant d'obtenir le phosphatide intact avec un meilleur rendement.

Nous avons suivi et développé la technique de Nègre et Boquet (17) utilisée par ces auteurs pour l'isolement de leur "antigène méthylique"\*. L'extraction au méthanol des lipides préalablement délipidés par l'acétone fournit une fraction qu'on sépare ensuite en deux parties: éthérosoluble et hydrosoluble. Par des ébullitions répétées de l'éthérosoluble avec de l'acétone, nous obtenons comme fraction insoluble presque exclusivement le phosphatidyl-inosito-dimannoside (114).

\* Fraction lipidique composée surtout de phospholipides présentant selon Nègre et Boquet des propriétés immunisantes et curatives dans différentes formes de tuberculose.

### Purification du phosphatide.

Afin de débarrasser le phosphatide étudié de tous les contaminants hydrosolubles et donner une preuve supplémentaire que les sucres font effectivement parties de la molécule, nous l'avons lavé selon Folch (115) de la façon suivante : on dissout le phosphatide dans le chloroforme additionné de méthanol et on laisse cette solution au contact avec de l'eau. Le phosphatide récupéré après ce traitement contient toujours le même pourcentage de sucre qu'avant.

Sa solution chloroformique, filtrée sur colonne de cellulose, fournit, après évaporation du solvant, une substance (rendement environ 2 % du poids sec des bacilles) pratiquement dépourvue d'azote qui se présente sous forme d'une poudre presqu'incolore, F. 215-217°, ( $\alpha$ )<sub>D</sub> = + 32° ; elle contient 2,54 % de phosphore, 30 % de sucres réducteurs, 14 % d'inositol et 7,5 % de glycérol. Sa composition centésimale correspond à peu près à la formule (C<sub>55</sub>H<sub>102</sub>O<sub>23</sub>P)<sub>2</sub> Mg que nous avons pu attribuer au phosphatide de la souche H-37 Rv streptomycino-résistante.

### Structure du phosphatidyl-inosito-di-D-mannoside.

#### Identification des acides gras.

La saponification alcaline ménagée de ce phosphatide permet d'obtenir, comme dans le cas de H-37 Rv s.r., les acides gras et une partie hydrosoluble. Les acides gras peuvent être fractionnés en liquides et solides en mettant à profit la différence de solubilité de leurs sels de plomb. L'analyse élémentaire de l'ester méthylique des acides solides montre qu'il s'agit d'un mélange de palmitate et de stéarate de méthyle. Ces esters, soumis à la chromatographie en phase gazeuse selon B.K. Beerthuis et J.C. Keppler (116), donnent deux pics correspondant aux esters palmitique et stéarique. La composition centésimale de l'ester liquide concorde à peu près avec la formule du tuberculostéarate de méthyle. La chromatographie en phase gazeuse présente trois pics, que nous pensons pouvoir identifier d'après leur temps d'élution avec les esters méthyliques des acides palmitoléique, octadécénoïque et tuberculostéarique. Après bromuration de ces esters seul le pic correspondant à l'acide tuberculostéarique subsiste.

#### Etude de la fraction hydrosoluble.

Les hydrolyses acides du phosphatide intact et de la fraction hydrosoluble, soit par ébullition dans l'acide sulfurique dilué, soit par chauffage avec l'acide chlorhydrique 6N, suivies d'une chromatographie sur papier dans différents mélanges de solvants nous ont permis d'identifier les constituants hydrosolubles du phosphatide examiné : glycérol, phosphore, méso-inositol, mannose et une faible tache correspondant au glucose.

Rappelons que les phosphatides de M. phlei ainsi que ceux de H-37 Rv s.r. cultivés dans les mêmes conditions que la souche BCG étudiée, c'est-à-dire sur milieu de Sauton, ne contenaient que du mannose.

Nous avons également soumis la fraction hydrosoluble, obtenue par saponification alcaline, à une hydrolyse acide ménagée et avons obtenu un mélange de phosphate d'inositol et d'acide glycérophosphorique accompagné d'une faible quantité de phosphore minéral, identifiés par chromatographie sur papier et révélation par le réactif molybdique : la révélation basée sur oxydation périodique a permis de déceler, en plus du mannose et du glucose, de l'inositol et du glycérol libres.

Le méso-inositol a été isolé à l'état cristallisé, F: 220-221°. Son acétate, préparé par action d'anhydride acétique dans la pyridine et purifié par chromatographie sur silicate de magnésium-célite (2:1) fond à 217-218° ; il n'y a pas de dépression de point de fusion en mélange avec l'acétate du méso-inositol authentique.

#### Position des acides gras.

Par analogie avec les autres phospholipides connus, nous avons admis que les deux acides gras qui entrent dans la composition du phosphatidyl-inositol-dimannoside du H-37 Rv s.r. (III) estérifient le glycérol. Nous avons voulu prouver cette hypothèse en isolant un diglycérade.

Pour ce faire, nous avons soumis le phosphatide de BCG à une hydrolyse acide ménagée selon Hanahan (117). L'extraction à l'éther du mélange réactionnel suivi de lavage au carbonate de soude, nous a permis d'isoler un produit neutre, F. 65-68°, contenant du glycérol et des acides gras de poids moléculaires 267 ; F. 56-60°. Il s'agit d'un diglycérade contenant des acides gras de poids moléculaire moyen 270 est de 15,4 %). Le rapport acides gras/glycérol est de 1,78. La chromatographie sur papier de la partie aqueuse provenant de la saponification du diglycérade montre une seule tache, au niveau du glycérol. Ces résultats permettent de conclure que les deux molécules d'acides gras du phosphatidyl-inositol-dimannoside sont liées au glycérol.

#### Méthylation du phosphatide intact selon Okuhara et Nukayama (44).

Pour établir l'enchaînement des constituants hydrosolubles du phosphatide étudié, nous avons entrepris de nouveau la méthylation du phosphatidyl-inositol-dimannoside. Comme nous disposions cette fois d'une plus grande quantité de produit, nous avons pu appliquer avec succès la méthode décrite par Okuhara et Nukayama. Après sept traitements successifs du phosphatide par l'iodure de méthyle et l'oxyde d'argent, nous obtenons une substance sirupeuse, jaune,  $(\alpha)_D = +14,5^\circ$ , dont le spectre I. R. ne présente qu'une très faible bande hydroxyle (voir fig. 3) Après hydrolyse acide et extraction des acides gras, la chromatographie sur papier de la fraction hydrosoluble selon la technique de Hirst, Hough et Jones (118) et la révélation par le phthalate acide d'aniline donnent deux taches identifiées aux triméthylmannose,  $R_f = 0,84$ , et tétraméthylmannose,  $R_f = 1$  ; les deux hexoses se trouvent en quantités à peu près égales.

L'obtention de tri- et de tétraméthylmannoses en quantités équimoléculaires semble bien prouver que le phosphatide a la structure correspondant à la formule IIb dans laquelle les deux hexoses forment un mannobiose attaché à un hydroxyle de l'inositol.

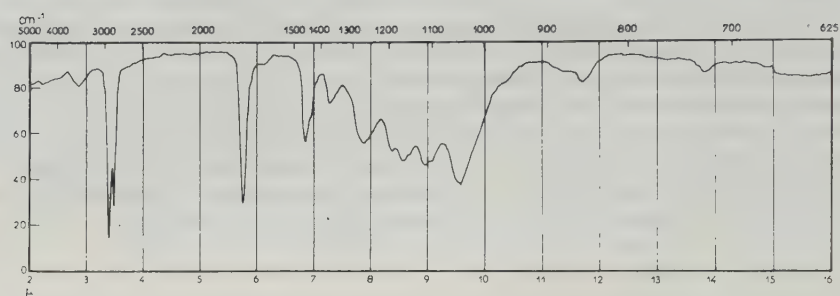


Figure 3. Phosphatide intact méthylé

### Essais d'isolement d'un mannobiose.

#### a) Acétolyse

Ayant prouvé la présence d'un mannobiose dans le phosphatidyl-inosito-dimannoside, nous avons cherché à isoler ce dimannoside.

Nous avons soumis le phosphatide intact à une acétolyse (action de l'acide et de l'anhydride acétiques) selon Aspinall et coll. (119). Ensuite le produit réactionnel est désacétylé par le méthylate de baryum et ses constituants identifiés par chromatographie sur papier. La révélation par le réactif molybdique permet de déceler la présence d'acide glycéro-phosphorique et de phosphate d'inositol ; une tache sur la ligne de départ correspond probablement à la substance non attaquée. L'acide périodique et la benzidine font apparaître les taches correspondant à l'inositol, glycérol, mannose, glucose, une tache de très faible intensité, de  $R_f$  voisin de celui d'un  $1 \rightarrow 6$  mannosido- $\alpha$ -mannose (\*), ainsi qu'une tache sur la ligne de départ. La révélation par le réactif de Partridge permet également d'identifier le mannose et le glucose et indique la présence d'une très faible quantité d'un produit inconnu au niveau du  $1 \rightarrow 6$  manno-sido- $\alpha$ -mannose. Cette substance constitue probablement le mannobiose recherché mais il se forme en si faible quantité que nous n'avons pas pu l'isoler.

#### b) Hydrolyse acide.

L'hydrolyse acide ménagée de la fraction hydrosoluble et le fractionnement des produits d'hydrolyse sur charbon nous ont fourni uniquement du mannose libre et de l'inositodimannoside ( $\alpha$ )<sub>D</sub> = + 76,5°, qui contient 67,4 % de sucres réducteurs et 32 % d'inositol. Le dimannoside ne se forme pas du tout au cours de l'hydrolyse.

Ces expériences ayant échoué, nous avons abandonné la tentative d'isolement et d'identification du mannobiose.

(\*) Nous remercions très vivement M. le Professeur J.K.N. Jones pour cet échantillon.

B. Etude des phospholipides d'un lot de BCG cultivé sur milieu peptoné et glycérimé.

L'examen préliminaire d'un nouveau lot de la souche BCG cultivée dans des conditions différentes (sur bouillon peptoné et glycérimé) nous a permis de déceler dans ses phosphatides, à côté des constituants signalés précédemment, la présence d'une quantité importante de glucose.

Des chromatographies sur papier de ce phosphatide intact selon Benson et Maruo (120) et de sa fraction hydrosoluble nous ont montré l'existence de plusieurs taches révélables par le réactif molybdique et par l'acide périodique.

Composition de l'hydrosoluble

La partie hydrosoluble a été déphosphorylée par chauffage avec de l'ammoniaque diluée et désionisée par l'Amberlite MB 3 (mélange de résines à groupement ammonium quaternaire et à groupement sulfoné). Nous avons voulu simplifier la préparation de la fraction polysaccharidique exempte de phosphore par traitement direct du phosphatide intact par l'ammoniaque en supprimant la saponification alcaline, mais le rendement n'était pas satisfaisant.

La chromatographie sur papier de l'hydrosoluble débarrassé du phosphore et la révélation au moyen de periodate montrent la présence d'inositol et de glycérol libres ainsi que de plusieurs substances à Rf inconnu (fig. 4).

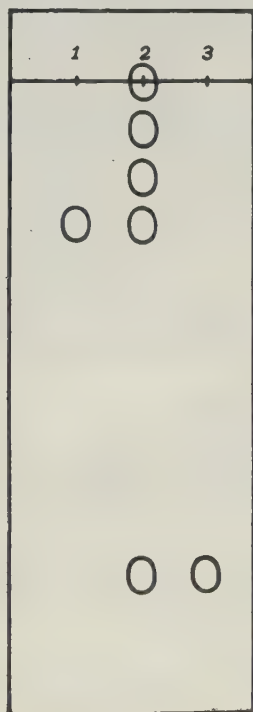


Figure 4

1. Inositol.
2. Hydrosoluble déphosphorylé.
3. Glycérol.

## Acétylation. Chromatographie et identification des acétates.

Afin d'identifier tous les constituants de la fraction hydrosoluble, nous avons acétylé le produit de déphosphorylation (sirop coloré) par l'anhydride acétique dans la pyridine à la température ambiante.

La chromatographie des acétates sur silicate de magnésium-célite (2:1) nous a donné les fractions suivantes (dans l'ordre d'élution) :

1) Le triacétate de glycérol, Eb. 0,02 60°, dont la composition centésimale est en accord avec la formule  $C_9H_{14}O_6$ .

2) L'hexaacétate d'inositol qui se présente sous forme de cristaux incolores fondant à 217-218° (pas de dépression de point de fusion en mélange avec un échantillon authentique); son analyse élémentaire concorde avec la formule  $C_{18}H_{24}O_{12}$ .

3) Un acétate qui cristallise sous forme d'aiguilles incolores, F. 79-80°,  $(\alpha)_D^{25} = +125^\circ$ . La substance, chauffée sous vide pendant quatre heures à 100°, fond à 101-104°. Après désacétylation par le méthylate de sodium selon Pratt et Richtmyer (121) et hydrolyse acide nous avons pu identifier par chromatographie sur papier l'inositol et le glucose. Le glucose a été également isolé à l'état de sa phénylosazone, F. 210-211° (pas d'abaissement de point de fusion en mélange avec la phénylosazone du glucose authentique). Les dosages de sucres effectués (à l'anthrone selon Johanson (109) sur l'acétate et sur la substance désacétylée indiquent la présence de cinq molécules de glucose pour une molécule d'inositol. Il semble donc que le produit isolé soit l'acétate d'inositopentaglucoside (fig. 5). Son analyse élémentaire est en accord avec la formule  $C_{78}H_{104}O_{52}$ .

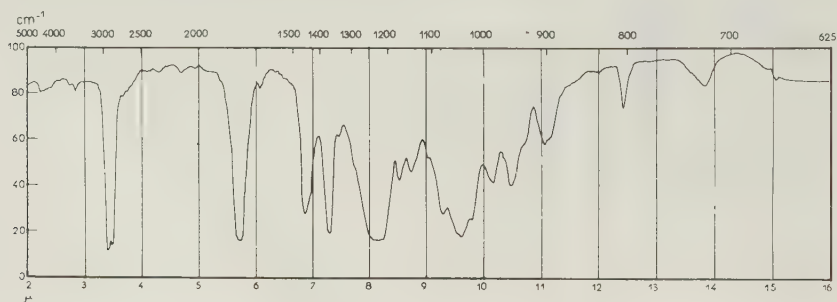


Figure 5. Acétate, F. 80°.

Notons que Pangborn a signalé l'isolement à partir des bacilles tuberculeux d'un "lipopolysaccharide" contenant 10,54 % d'inositol, 50 % de mannose et 1,7 % de phosphore. D'après ces chiffres il s'agit très probablement d'un inositopentamannoside. D'autre part S. Nojima nous a communiqué un manuscrit (\*) décrivant l'isolement à partir des cires D du BCG d'une fraction correspondant à un phosphatidyl-inositopentamannoside.

-----  
(\*) Travail paru entre-temps dans un Journal of Biochemistry, 1959, p. 607.

4) Un acétate F. 178-180°,  $(\alpha)_D^{21} = + 20,5^\circ$ , sous forme de belles aiguilles fines, en très faible quantité. La désacétylation et l'hydrolyse de ce produit donnent une molécule d'inositol et une molécule de mannose. (La composition centésimale de cet acétate concorde avec la formule  $C_{30}H_{40}O_{20}$  d'un nonaacétate d'inositomannoside (fig. 6, p. 45).

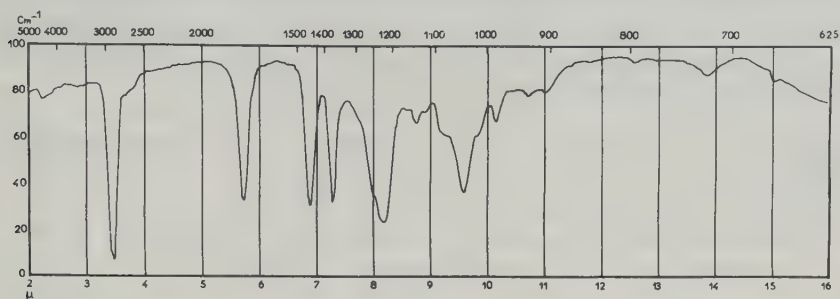


Figure 6. Acétate F. 178-180°

5) Un acétate F. 135-136°,  $(\alpha)_D^{21} = + 54^\circ$ , sous forme d'une poudre microcristalline incolore. Les dosages de sucres effectués sur l'acétate et sur le produit désacétylé montrent que nous avons affaire à un inositodimannoside (fig. 7). L'inositol et le mannose ont été identifiés, par chromatographie sur papier. L'analyse élémentaire de l'acétate F. 136° est en accord avec la formule  $C_{42}H_{56}O_{28}$  d'un dodécaacétate d'inositodimannoside.

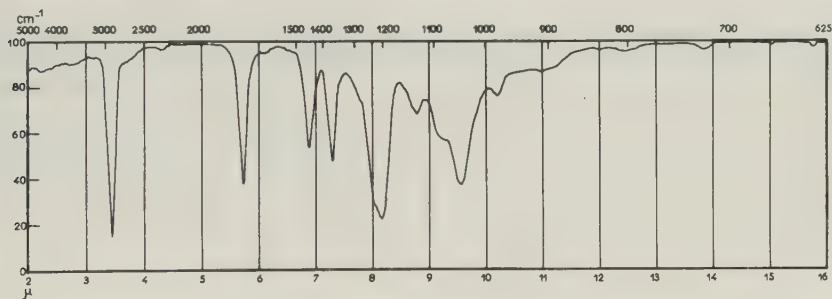


Figure 7. Acétate F. 135-136°.

Ces résultats semblent indiquer que les phospholipides du BCG cultivé sur bouillon peptoné et glycérimé se composent d'un phosphatidyl-inositol dépourvu de sucres (39 %) (\*), d'un phosphatidyl-inosito-penta-glucoside (8 %), d'un phosphatidyl-inosito-monomannoside (5 %) et d'un phosphatidyl-inositol-dimannoside (48 %) (123).

(\*) Ces chiffres très approximatifs indiquent les poids en pourcentage phosphatide brut.

Signalons que les acides gras obtenus par saponification alcaline de ce mélange de phosphatides intacts sont les mêmes que ceux isolés du précédent, à savoir les acides palmitique, stéarique, palmitoléique, octadécénoïque et tuberculostéarique.

Etant donné la complexité des phospholipides extraits de la souche étudiée, nous avons abandonné notre projet initial de méthylation du phosphatide intact afin d'établir la structure exacte de l'inosito-dimannoside et avons envisagé la méthylation de l'inosito-dimannoside isolé et purifié par l'intermédiaire de son acétate F. 135-136°.

#### Structure de l'inosito-dimannoside ; nature de la liaison mannose - mannose.

L'acétate d'inosito-dimannoside F. 136° a été désacétylé par le méthylate de sodium en quantité catalytique (121). Le "trisaccharide" ainsi préparé,  $(\alpha)_D = +77^\circ$ , se décompose vers 255° ; il contient 67 % de sucres réducteurs et 32 % d'inositol. Quant à la liaison entre les deux mannoses, nous pensons pouvoir lui attribuer la configuration  $\alpha$ , en nous basant, d'une part sur le fait que l'inosito-dimannoside et son acétate sont fortement dextrogyres  $(\alpha)_D$  du D-mannose est de  $-17^\circ \rightarrow +14,6^\circ$  ; d'autre part le pouvoir rotatoire du dodécaacétate de l'inosito-dimannoside est  $+54^\circ$ , tandis que celui de nonaacétate d'inosito-mannoside =  $+20,5^\circ$ . Récemment Gerin et Perlin décrivent un 1 $\rightarrow$ 6 $\alpha$ -mannobiose obtenu par synthèse, dont le pouvoir rotatoire est de  $+57^\circ$  (150). Etant donné que celui de l'inosito-dimannoside est de  $+77^\circ$ , nous pouvons en conclure que la liaison inositol-mannose possède également la configuration  $\alpha$ . L'inositol-di-D-mannoside préparé par désacétylation

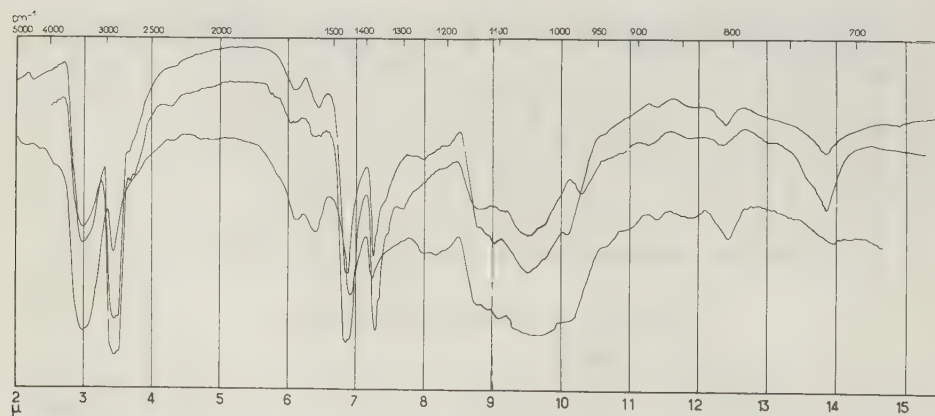


Figure 8

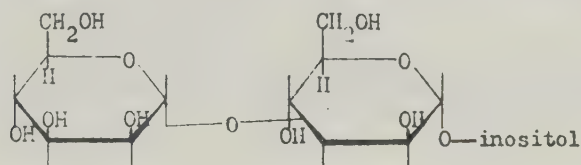
- a) H-37 Rv s.r. Inosito-dimannoside.
- b) BCG. Inosito-dimannoside obtenu par désacétylation de son dodécaacétate.
- c) BCG. Inosito-dimannoside obtenu par hydrolyse ménagée du phosphatid-inosito-dimannoside.

de son acétate est identique à celui obtenu directement par déphosphorylation de la fraction hydrosoluble du phosphatidyl-inosito-dimannoside de la souche H-37 Rv streptomycino-résistante et à l'inosito-dimannoside isolé par hydrolyse acide ménagée et chromatographie sur charbon à partir de BCG cultivé sur milieu de Sauton (voir les spectres IR .fig. 8).

### Oxydation périodique.

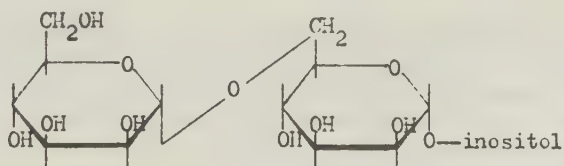
L'oxydation périodique de l'inosito-dimannoside nous a permis d'obtenir quelques renseignements quant à la liaison entre les deux hexoses.

Tout d'abord le produit soumis à l'oxydation périodique pendant 18 heures à l'obscurité à la température ambiante et chromatographié ensuite sur papier ne contient plus de mannose intact. Ce fait permet d'exclure une liaison 1→3 entre les deux molécules de mannose (en admettant que le mannose se trouve sous sa forme pyranosique (formule I).



I

D'autre part, ce produit consomme dans les conditions décrites plus haut 8,06 molécules de periodate ce qui est en accord avec le chiffre théorique (8 mol) calculé pour l'inositol lié à un mannobiose comportant une liaison glycosidique 1→6 (formule II). L'inosito-dimannoside dont le mannobiose posséderait une liaison 1→2 ou 1→4 consommerait 7 mol de periodate ; dans le cas d'une liaison glycosidique en 1→3 cette consommation serait de 6 molécules.



II

### Oxydation selon Hough (124).

L'inosito-dimannoside, obtenu par désacétylation de son acétate, soumis à l'oxydation par le métaperiodate de sodium en présence d'un tampon phosphate à pH 8, ne libère pratiquement pas de formol (0,019 mol.). Or, d'après les travaux de Hough, les disaccharides comportant

des liaisons glycosidiques 1→2, 1→3 ou 1→4, oxydés dans les mêmes conditions, subissent une sur-oxydation et fournissent deux molécules d'aldéhyde formique, alors que dans le cas de dissacharides liés en 1→6 la sur-oxydation et la formation de formol n'ont pas lieu. Le comportement de l'inosito-dimannoside dans cet essai indiquerait donc également la présence d'une liaison glycosidique en 1→6. Nous avons vérifié que le galactinol (\*) (1-0- -D-galactopyranosyl-mésosoinositol), soumis à la même oxydation, libère 0,94 mol d'aldéhyde formique tandis que l'inositol n'en donne que 0,012 mol.

#### Méthylation.

L'inosito-dimannoside a été méthylé d'abord par le sulfate de méthyle en présence de soude, puis par l'iodure de méthyle et l'oxyde d'argent. La substance perméthylée (voir spectre I.R., fig. 9) a été soumise à une hydrolyse acide et chromatographiée sur papier. La révélation par le réactif de Partridge montre la présence de deux taches ayant les Rf des triméthyl et tétraméthylmannoses (Rf = 0,84 et 1).

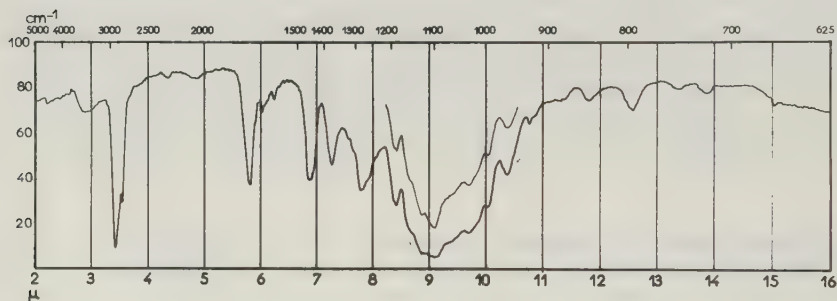
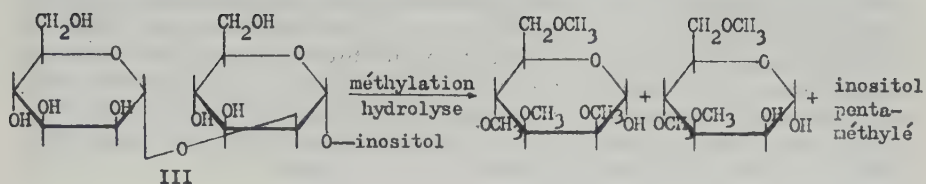


Figure 9. Inosito-dimannoside méthylé.

Ces sucres méthylés ne se révèlent pas par le système acide périodique-benzidine utilisé généralement pour la révélation des substances possédant un ou plusieurs groupements glycols 1,2. Ceci prouve que les deux mannoses méthylés possèdent un méthoxyle sur le carbone C<sub>2</sub> et exclut toute liaison glycosidique en 2 (formule III).

-----  
 (\*) Nous adressons nos plus vifs remerciements à M. le Professeur Ballou pour l'échantillon de galactinol qu'il a aimablement mis à notre disposition.



Les liaisons 1→2 et 1→3 étant exclues, la liaison glycosidique entre les deux mannoses ne peut donc être que 1→4 ou 1→6. Comme nous l'avons signalé plus haut, les résultats d'oxydation périodique sont en faveur de la position 1→6. Nous avons pu apporter encore d'autres preuves en ce qui concerne cet enchainement des deux hexoses.

D'après le travail de Hough, Jones et Wadman (125), cité par Orlova (126), les aldohexoses méthylés possédant l'hydroxyle en 4 libre se révèlent spécifiquement par le trichloroacétate de N,N'-diméthylaniline en donnant une coloration violette.

Nous avons chromatographié sur papier les triméthyl- et tétraméthyl-mannoses isolés de l'inosito-dimannoside ainsi qu'un échantillon provenant de l'hydrolyse d'un galactomannane de luzerne méthylé (\*) composé de 2, 3, 4, 6-tétra-O-méthyl-D-galactose, 2, 3, 6-tri-O-méthyl-D-mannose et 2, 3-di-O-méthyl-D-mannose.

Les deux dérivés méthylés isolés de notre phospholipide ne se révèlent pas par le réactif employé tandis que les di- et triméthylhexoses provenant de galactomannane donnent la coloration caractéristique ; ceci semble prouver que l'hydroxyle en 4 du triméthylmannose extrait du phosphatide bacillaire est porteur d'un groupement méthoxyle. La révélation ultérieure du même chromatogramme par le phtalate acide d'aniline fait apparaître les taches de tous les dérivés méthylés (voir fig. 10).

D'autre part, nous avons soumis le triméthylmannose, après chromatographie et élution du papier, à l'oxydation périodique selon Greville et Northcote (127). Ces auteurs ont démontré qu'à pH 7,5 seul des quatre isomères possibles, le 2,3,4-O-triméthylglucose consomme rapidement une molécule de periodate.

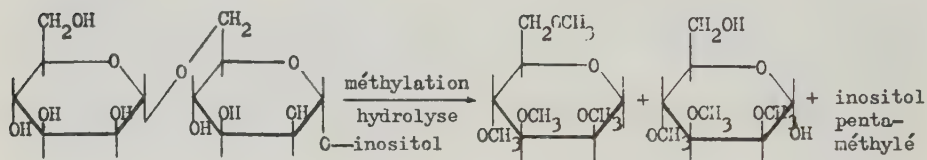
Le sucre étudié absorbe en cinq heures à la température ambiante ; à l'obscurité, 0,81 molécule de periodate. Nous avons pris soin de vérifier que le 2, 3, 6-O-triméthyl-D-mannose (provenant de galactomannane) ne consomme pratiquement rien dans les mêmes conditions. Ces résultats semblent prouver que le triméthylmannose isolé de l'inosito-dimannoside est le 2, 3, 4-O-triméthyl-D-mannose. Ce dérivé méthylé est liquide et nous n'avons pas réussi à préparer de dérivé cristallisé. Haworth, Hirst, Isherwood et Jones signalent que le 2, 3, 4-O-triméthyl-D-mannose ne donne ni d'anilide ni de phénylhydrazone cristallisée (128).

-----

(\*) Nous remercions M. le Professeur J.K.N. Jones d'avoir aimablement mis à notre disposition l'échantillon de ce polysaccharide méthylé.

Le 2, 3, 4, 6-0-tétraméthyl-D-mannose a été isolé après hydrolyse de l'inosito-dimannoside méthylé par extraction chloroformique (le triméthyl-mannose reste dans la phase aqueuse) et nous l'avons cristallisé à l'état d'anilide F. 141-143° (pas d'abaissement de point de fusion en mélange avec l'échantillon authentique). L'obtention de cet anilide prouve que le mannose se trouve sous sa forme pyranosique.

En conclusion, nous avons mis en évidence dans l'inosito-dimannoside la présence d'une liaison glycosidique en 1→6 (IV).



#### Nature de la liaison acide phosphorique-inositol; essais d'identification du phosphate d'inositol.

Les monophosphates du méso-inositol obtenus par différentes méthodes sont étudiés par plusieurs écoles. Ainsi Desjobert (129) obtient le mono-phosphate du méso-inositol par hydrolyse alcaline de l'hexaphosphate d'inositol (phytine); McCormick et Carter (130), Posternak et Posternak (131) le préparent par action enzymatique sur le même

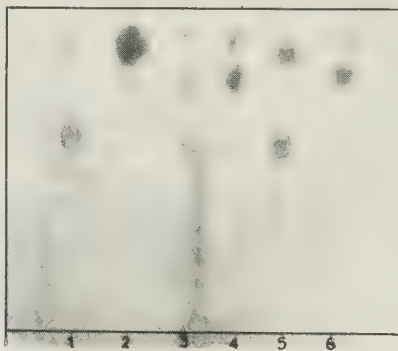
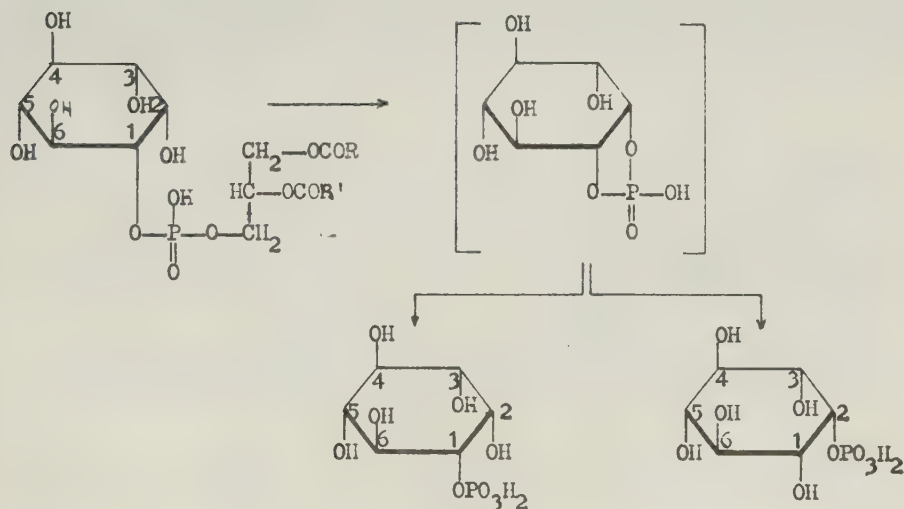


Figure 10

1. Galactomannane.
2. Extrait chloroformique.
3. Di-, tri- et tétraméthylmannose.
4. Extrait acétonique.
5. Galactomannane.
6. Extrait acétonique.

hexaphosphate. D'après les travaux de Brown et Hall (132) et Pizer et Ballou (133) ce produit est identique avec le 2-phosphate préparé par Iselin (134) par voie synthétique. D'autre part, Pizer et Ballou (133) ont démontré que le phosphate d'inositol obtenu par saponification alcaline de phospholipides de soja, du cœur de bœuf et du foie de mammifères est principalement le 1-phosphate du méso-inositol accompagné toutefois par une très faible quantité de 2-phosphate d'inositol. Comme, pendant la saponification alcaline de phosphoinositides, il se forme un phosphate cyclique intéressant deux hydroxyles adjacents de l'inositol (135), les auteurs en déduisent que c'est bien le 1,2-phosphate cyclique qui constitue cet intermédiaire et s'hydrolyse ensuite en 1-phosphate et 2-phosphate d'inositol. La liaison en 2 étant probablement plus facilement attaquée, on retrouve presque uniquement le 1-phosphate dans les hydrolysats alcalins.

Les travaux de Khorana et coll. (136, 137) d'une part et de Posternak (138) d'autre part confirment entièrement ce point de vue. En effet, le 1,2-phosphate cyclique, préparé par action du dicyclohexylcarbodiimide sur le 2-phosphate du méso-inositol et soumis à l'action ménagée des alcalis ou acides, fournit un mélange de 1-phosphate et de 2-phosphate du méso-inositol. Pizer et Ballou (133) ainsi que Posternak (138) signalent également la possibilité de la conversion de 1-phosphate en 2-phosphate et vice-versa sous l'action d'acides dilués.



Les résultats de Faure, Coulon-Morelec et Le Cocq (139) permettent de préciser la position de l'acide phosphorique sur l'inositol dans les inositolphosphatides intacts isolés du germe de blé et du muscle cardiaque.

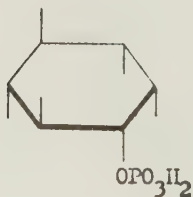
Ces auteurs obtiennent par chauffage des sels de baryum du phosphatidyl-inositol dans l'acide acétique les diglycérides et le phosphate d'inositol cyclique,  $(\alpha)_D = -19^\circ$ , qui, secondairement, donne un ester inositophosphorique optiquement inactif. L'isolement d'un phosphate d'inositol cyclique doué de pouvoir rotatoire permet d'affirmer que l'inositol est lié à l'acide phosphorique par un carbone autre que le 2 ou le 5 (situés dans le plan de symétrie de cette molécule), très vraisemblablement par le carbone 1 (ou 3).

Brockerhoff et Hanahan (140) prouvent par une autre voie que c'est bien le carbone asymétrique de l'inositol qui est engagé dans la liaison ester phosphorique des inositophosphatides.

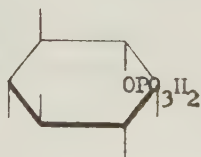
Ils préparent à partir du phosphatidyl-inositol un glycérophosphate d'inositol et le soumettent à l'oxydation périodique sélective; celle-ci dégrade le glycérol sans toucher à l'inositol. Le produit de réaction est optiquement actif, et comme la contribution du glycérol est éliminée, son pouvoir rotatoire est dû à la liaison acide phosphorique-inositol.

Récemment Ballou et Pizer (141) préparent par synthèse à partir du galactinol (1-0- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-méso-inositol) le 1-phosphate de méso-inositol dont le spectre I.R. et le comportement chromatographique sont identiques avec ceux du phosphate d'inositol isolé à partir de phospholipides de soja par saponification alcaline. L'activité optique de ces deux substances est égale en valeur absolue mais de signe contraire; elles constituent donc deux antipodes optiques. Rappelons que le 2-phosphate de méso-inositol est optiquement inactif.  $\checkmark$

D'après ces résultats, Ballou et Pizer concluent que le phosphate de méso-inositol isolé des phosphatides de soja est le 3-phosphate de méso-inositol.



Phosphate d'inositol synthétique



Phosphate d'inositol  
à partir de phosphatides

Les auteurs anglais Davies et Malkin (142) publient dernièrement des résultats contradictoires. Ils réalisent, ainsi que Ellis et Hawthorn (143), une synthèse de glycérophosphate d'inositol dans lequel l'acide phosphorique estérifie l'hydroxyle en 2 de l'inositol, et comparent ce produit synthétique avec le glycérophosphate d'inositol obtenu à partir du phosphatidyl-inositol isolé du foie de bœuf. D'après ces auteurs, les phosphates d'inositol obtenus par saponification alcaline de phosphatide naturel et du produit synthétique seraient identiques; il n'y aurait pas de migration du groupe phosphorylé au cours de l'hydrolyse.

Tout récemment, à la suite de travaux de Ballou, Hawthorne et coll. reprennent leur travail et constatent que le monophosphate d'inositol préparé à partir de phosphatides de soja est optiquement actif et identique avec celui de Ballou et Pizer. D'autre part, le phosphatide d'inositol isolé du foie de bœuf par hydrolyse enzymatique se comporte également comme le 1 ou 3-phosphate d'inositol (144).

Afin de déterminer le point d'attache de l'acide phosphorique sur l'inositol dans le phosphatidyl-inosito-dimannoside, nous avons soumis la fraction hydrosoluble préparée par la saponification alcaline du phos-

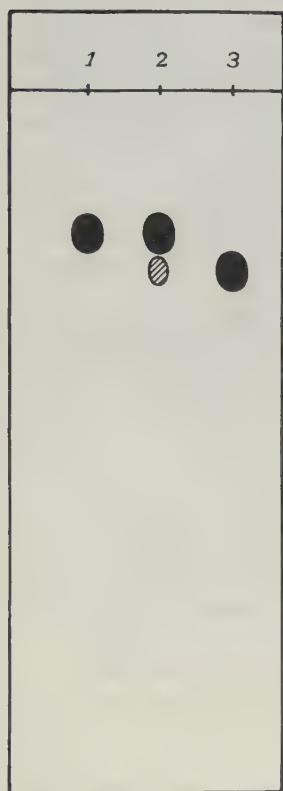


Figure 11

1. 1-monophosphate d'inositol.
2. Hydrolysât.
3. 2-monophosphate d'inositol.

phatide intact, à une hydrolyse acide ménagée pour enlever les sucres liés à l'inositol. La chromatographie sur papier du produit réactionnel, effectuée dans le laboratoire du Professeur Ballou (\*), a mis en évidence la présence de deux substances : une principale, à  $R_f$  identique au 1-phosphate du méso-inositol et la deuxième, en faible quantité, correspondant au 2-phosphate du méso-inositol. Nous avons également chromatographié ce mélange et obtenons deux taches bien délimitées dont une faible, au niveau du 2-phosphore d'inositol mis à notre disposition par le Professeur Posternak \*\*), et la seconde, beaucoup plus importante, qui semble être le 1-phosphate d'inositol (voir schéma fig. 11, p. 53 ).

-----  
 (\*) Nous remercions très vivement M. le Professeur Ballou d'avoir bien voulu effectuer ces essais.

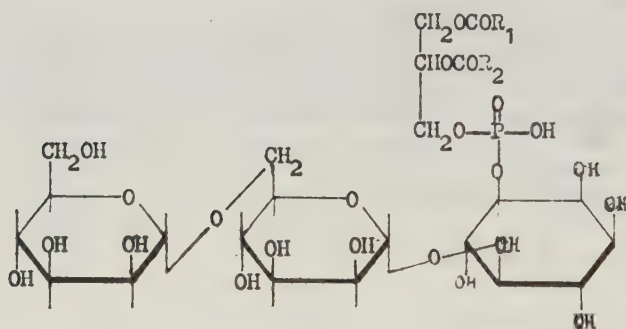
\*\*) Nous adressons nos plus vifs remerciements à M. le Professeur Posternak pour cet échantillon.

Le phosphatidyl-inosito-dimannoside intact soumis uniquement à une hydrolyse acide fournit également le mélange de 1-phosphate et de 2-phosphate de méso-inositol.

La faible activité optique du 1-phosphate de méso-inositol  $(\alpha)_D = + 3,4^\circ$  dans l'eau à pH 9;  $(\alpha)_D = - 9,8^\circ$  dans l'eau à pH 2 (141), jointe à la présence, dans nos préparations, de traces de sucres dont nous n'arrivons pas à nous débarrasser, nous interdisent l'emploi de mesures de rotation optique pour apporter une preuve de structure présumée et calculer les proportions des deux phosphates d'inositol présent dans le mélange.

En conclusion, dans le phosphatidyl-inosito-di- $\alpha$ -D-mannoside ayant subi l'hydrolyse alcaline et acide, l'acide phosphorique est lié à l'inositol par le carbone 1 ou 3.

A la lumière de ces travaux, nous pouvons proposer pour le phosphatidyl-inosito-di- $\alpha$ -D-mannoside la formule développée suivante où seul reste à déterminer le point d'attache du mannobiose sur l'inositol.



$R_1$  et  $R_2$  correspondent aux restes d'acides gras.

## TECHNIQUES EMPLOYEES

### A. Chromatographie.

Au cours de notre travail nous avons souvent eu recours à la chromatographie, à la fois comme méthode préparative et comme méthode analytique.

#### Chromatographie sur colonne

Nous avons employé la technique du chromatogramme liquide développé par Reichstein (145) en utilisant comme adsorbant, suivant le cas, l'acide silicique Mallinckrodt, le trisilicate de magnésium Siegfried, Zofingen, Suisse, ou le charbon Darco G 60. Tous ces adsorbants ont été mélangés avec de la célite. L'acide silicique a été activé avant usage par chauffage à 110° pendant quelques heures.

#### Chromatographie sur échangeurs d'ions.

La séparation des acides aminés a été effectuée sur colonne de Dowex 50 (350-400 mesh) sous forme de sel d'ammonium.

#### Chromatographie sur papier

Pour les nombreuses chromatographies de partage effectuées au cours de ce travail, nous avons utilisé les papiers Whatman N° 1, 3 et 4, ainsi que le papier Arches 304. Nous avons appliqué suivant le cas la technique descendante ou ascendante. Comme révélateurs nous nous sommes servis de :

1. Réactif de Partridge (146) (révélation des sucres réducteurs) composé de :

0,93 g. d'aniline  
1,66 g. d'acide phtalique  
90 cm<sup>3</sup> de butanol et 10 cm<sup>3</sup> d'eau

2. Réactif de Hanes et Isherwood (147) modifié par Burrows (148) (révélation de composés phosphorylés) composé comme suit :

1 g de molybdate d'ammonium dissous dans 8 cm<sup>3</sup> d'eau  
+ 3 cm<sup>3</sup> de HCl concentré  
+ 3 cm<sup>3</sup> de HClO<sub>4</sub> à 70 %.  
on complète avec de l'acétone à 100 cm<sup>3</sup>.

Après avoir aspergé la feuille avec ce réactif, on la sèche quelques minutes à 85°, puis on la soumet à l'action des rayons U.V. selon Bandurski et Axelrod (149). Ce traitement accélère l'apparition de taches.

3. Acétate d'uranyle en solution aqueuse à 1 % selon Sammons et Meredith (\*) (révélation de l'inositol). Le chromatogramme, immergé dans ce réactif et séché, permet de déceler dans la lumière U.V. des taches fluorescentes au niveau de l'inositol.

4. Acide periodique et benzidine selon Gordon, Thornburg et Werum (151), utilisé pour la révélation de substances comportant une ou plusieurs fonctions glycol 1,2 comme glycérol, inositol et sucres.

Ce réactif est composé par : acide periodique N/10 (solution aqueuse) dilué ensuite au 1/20 dans l'acétone et benzidine préparée comme suit : 184 mg dans 0,6 cm<sup>3</sup> d'acide acétique + 4,4 cm<sup>3</sup> d'eau + 95 cm<sup>3</sup> d'acétone.

Le chromatogramme, d'abord oxydé par l'acide periodique pendant 5 à 10 minutes, est immergé dans la solution de benzidine : apparition de taches blanches sur fond bleu.

5. Acétate de cuivre en solution aqueuse à 1 % et Rhodamine B en solution aqueuse à 0,1 %, d'après la technique de Savary (152) pour la révélation des acides gras.

6. Trichloroacétate de N,N diméthylaniline, préparé selon Hough, Jones et Wadman (125) :

5 g. d'acide trichloroacétique et 2 g. de N,N diméthylaniline sont dissous dans 100 cm<sup>3</sup> d'acide acétique glacial. La révélation se fait par pulvérisation du réactif.

### Chromatographie en phase gazeuse

Les acides gras préalablement méthylés ont été chromatographiés avec un appareil "VPC Mark I" Griffin and George Ltd. La colonne de 6,35 x 1750 était remplie de célite imprégnée de silicone fluide 550 à 30 %.

### B. Electrophorèse sur papier

Pour la séparation et l'identification des acides aminés nous avons utilisés l'électrophorèse sur papier Whatman N° 1 avec un tampon véronal-véronal sodique à pH 8,4 dans l'appareil d'après M. Lederer.

### C. Techniques analytiques.

Les points de fusion ont été déterminés à l'aide de l'appareil de Kofler sous microscope.

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés soit avec un polarimètre de Jobin et Yvon (raie J de la lampe à vapeur de mercure), soit avec un polarimètre de Hilger (raie D de la lampe à sodium).

(\*) Nous remercions M. J.N. Hawthorne de nous avoir communiqué cette méthode inédite.

Les dosages d'acidité ont été effectués sur des quantités de substances de l'ordre de 3 à 7 mg. à l'aide d'une ultramicroburette Gilmont, au moyen de potasse en solution éthanolique N/50 (titrée par l'acide benzoïque) en présence de phénol-phtaléine.

Les dosages de phosphore selon Machebœuf et Delsal (153) ont été effectués sur 1 à 2 mg. de phospholipides. Cette méthode est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique par l'hydroquinone donnant une coloration bleue dont l'intensité est mesurée spectrophotométriquement à 700 m $\mu$ .

Le glycérol a été dosé selon Denigès sur 20 à 25 mg. de substances. Le phosphatide est d'abord hydrolysé par l'acide chlorhydrique 6 N, les lipides sont extraits à l'éther et la fraction hydrosoluble lavée à l'eau jusqu'à neutralité. Ensuite la solution aqueuse est chauffée pendant deux heures à 150° selon Faure (154) afin d'hydrolyser complètement l'acide glycérophosphorique. Après la défécation de sucres par le sulfate de cuivre 20 % et la chaux, on oxyde le glycérol libéré en le chauffant pendant 20 minutes au bain-marie bouillant par l'eau de brome 0,3 %. L'excès de brome est chassé par ébullition de la solution, on en prélève 0,5 cm<sup>3</sup> et ajoute quelques gouttes de solution alcoolique de codéine à 5 % et 2 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique concentré. Après chauffage (1 minute environ) il se développe la coloration vert canard. La mesure de son intensité est effectuée à 650 m $\mu$ .

Le dosage des sucres réducteurs est effectué par le réactif à l'anthrone sur 1 à 2 mg. de phospholipides selon la technique de Johanson (104). Le produit contenant les sucres est mis en suspension ou dissous dans 3 cm<sup>3</sup> d'eau et additionné de 9 cm<sup>3</sup> de solution sulfurique (acide sulfurique à 96 %) d'anthrone à 0,1 %. Ce mélange est chauffé au bain-marie bouillant pendant 15 à 30 minutes. La solution devient vert-brun. La lecture au spectrophotomètre est faite à 620 m $\mu$ .

Les acides aminés ont été dosés selon Troll et Connan (155). 0,5 cm<sup>3</sup> de solution contenant les acides aminés (pH 1-8) sont additionnés de 1 cm<sup>3</sup> de réactif contenant 2 % de cyanure de potassium 0,01 M et 98 % de pyridine et de 1 cm<sup>3</sup> de solution phénolique à 80 %. Ce mélange réactionnel est chauffé au bain-marie bouillant; quand la température de la solution analysée atteint celle du bain-marie on ajoute 0,2 cm<sup>3</sup> de ninhydrine dans l'alcool à 5 %. Après 5 minutes de chauffage on refroidit la solution, on la dilue avec l'alcool 60 % à 10 cm<sup>3</sup> et mesure l'intensité de sa coloration à 570 m $\mu$ .

L'aldéhyde formique a été dosé selon la technique décrite par Organic Analysis (156). A la solution contenant le formol on ajoute le réactif chromotrope et on chauffe le mélange réactionnel pendant 30 minutes au bain-marie bouillant. Il se développe la coloration violette; après refroidissement on mesure son intensité à 570 m $\mu$ .

Le réactif chromotrope est préparé comme suit : on dissout 1 g. d'acide chromotrope dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau; on filtre la solution et on l'ajuste à 500 cm<sup>3</sup> avec un mélange d'acide sulfurique concentré-eau (2:1).

Tous les dosages colorimétriques à une longueur d'onde déterminée ont été effectués à l'aide du spectrophotomètre U.N.I.C.A.M.

Le dosage de l'inositol selon Böhm et Richarz (110) a été effectué sur le produit d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6 N. L'hydrosoluble obtenu est chromatographié sur papier Whatman N° 4 dans le mélange isopropanol-acide acétique-eau (6:3:1). On localise la position de l'inositol sur la feuille; il est ensuite élué du papier et on l'oxyde par periodate de sodium 0,01 M pendant 2 h. 30 mn. à 40°. Le periodate consommé est titré avec le thiosulfate de sodium.

Les dosages des fonctions glycol 1, 2 ont été effectués avec du periodate suivant la méthode de Fleury et Lange (157).

Les microdosages de carbone-hydrogène, d'azote (selon Dumas) et de méthoxyle (selon Zeisel) ont été effectués dans les laboratoires de micro-analyse de la Ciba (Bâle), directeur Dr. Gysel, et de la Faculté de Médecine (Paris), directeur Madame Abramson.

Les spectres d'absorption infrarouge ont été mesurés soit avec un appareil de Perkin-Elmer au laboratoire de spectrographie infrarouge de la Ciba (directeur Dr. Ganz), soit avec un appareil de Baird au laboratoire de spectrographie infrarouge de la Faculté de Pharmacie de Paris (directeur Professeur Guy).

Les spectres d'absorption ultraviolette ont été mesurés avec le spectrophotomètre Jobin et Yvon.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### CHAPITRE I

#### LES PHOSPHOLIPIDES DE MYCOBACTERIUM PHLEI

##### Purification des phospholipides

Dans une expérience type 30 g. de lipides insolubles dans le méthanol chaud (extraits par Snow et coll. (91) sont mis en suspension dans 300 cm<sup>3</sup> d'acétone et chauffés à reflux pendant 30 minutes. On décante ensuite la solution chaude et répète le même traitement cinq fois. Le résidu est repris par 250 cm<sup>3</sup> d'éther, filtré et le filtrat précipité par 500 cm<sup>3</sup> d'acétone. Par centrifugation à froid (3000 tours/min. à -4°) nous isolons 12,8 g. de phosphatide F. 219-222°.

5 g. de ce produit sont dissous dans 50 cm<sup>3</sup> de chloroforme et filtrés sur 150 g. de poudre de cellulose Whatman. La colonne est éluée par le chloroforme (portions de 1 litre).

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| 1. Chloroforme. . . . . | 0        |
| 2. Chloroforme. . . . . | 3264 mg. |
| 3. Chloroforme. . . . . | 1682 mg. |
| 4. Chloroforme. . . . . | traces   |
|                         | <hr/>    |
|                         | 4946 mg. |

Le produit récupéré est dissous dans 40 cm<sup>3</sup> d'éther et précipité par 60 cm<sup>3</sup> d'acétone. La centrifugation à froid (comme plus haut) permet d'obtenir 4,9 g. de phosphatide F. 219-222°, teneur en phosphore 1,6 %, en azote 1,58 %.

##### Composition des phospholipides

##### Saponification alcaline et identification des acides gras

900 mg. de phosphatide sont dissous dans 10 cm<sup>3</sup> de benzène et additionnés de 1 cm<sup>3</sup> de potasse alcoolique (éthanol absolu) à 15 %. Après 24 heures à la température ambiante on filtre le précipité gélatineux formé; en dissolvant dans l'eau on obtient une solution laiteuse que l'on acidifie par l'acide acétique. Cette phase aqueuse est extraite à l'éther. L'étherosoluble ajouté au filtrat benzénique évaporé à sec fournit 510 mg. d'acides gras de poids moléculaire moyen 257. 7.

200 mg. de ces acides sont dissous dans 5 cm<sup>3</sup> d'éther et méthylés par le diazométhane en solution étherée à la température ambiante pendant 5 heures. Les esters ainsi obtenus sont distillés dans un tube à

boules à 110-120° sous 0,02 mm (chauffage au bain d'air dans une enceinte close sous vide poussé). L'analyse élémentaire de cet ester méthylique F. 27-29° indique qu'il s'agit du palmitate de méthyle pur.

|                |                   |             |         |         |                       |
|----------------|-------------------|-------------|---------|---------|-----------------------|
| <u>Analyse</u> | $C_{17}H_{34}O_2$ | calculé % : | C 75,50 | H 12,67 | OCH <sub>3</sub> 5,5  |
|                |                   | trouvé % :  | C 75,56 | H 12,53 | OCH <sub>3</sub> 5,19 |

Nous avons également préparé l'ester méthylique de l'acide palmitique pur et le mélange des deux ne présente pas d'abaissement du point de fusion.

100 mg d'ester F. 27-29° sont chauffés à reflux avec 10 cm<sup>3</sup> de potasse alcoolique à 5 % pendant 3 heures. Après le traitement habituel, la fraction acide cristallise à la température ambiante et fond à 60-62° (litt. : 62-63°).

#### Analyse de la fraction hydrosoluble

##### Identification du mannose

400 mg. de la fraction hydrosoluble sont chauffés dans 10 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique à 5 % à reflux pendant 4 heures. La solution est ensuite désionisée par l'Amberlite MB 3, concentrée sous vide à 4 cm<sup>3</sup> et additionnée de 0,3 g. de phénylhydrazine dans 1 cm<sup>3</sup> d'éthanol absolu. On chauffe quelques instants et la cristallisation s'amorce aussitôt. La phénylhydrazone du D-mannose, recristallisé dans l'alcool à 60 % présente les constantes physiques suivantes : F. 190-192°, ( $\alpha$ )<sub>J</sub> = + 28° (C = 0,52, pyridine); litt. F. 194-195°; ( $\alpha$ )<sub>D</sub> = + 27,8→28,6° (éthanol-pyridine)

|                |                      |             |         |        |         |
|----------------|----------------------|-------------|---------|--------|---------|
| <u>Analyse</u> | $C_{12}H_{18}O_5N_2$ | calculé % : | C 53,32 | H 6,71 | N 10,37 |
|                |                      | trouvé % :  | C 53,20 | H 6,74 | N 10,65 |

D'autre part, nous avons chromatographié la fraction hydrosoluble après hydrolyse et désionisation sur papier Whatman N° 1 dans :

- a) Butanol-acide acétique-eau (4:1:5);
- b) Phénol saturé d'eau contenant 1 % d'ammoniaque.

Les deux chromatogrammes révélés par le réactif de Fartridge montrent une seule tache correspondant au mannose, a) R<sub>f</sub> = 0,21, b) R<sub>f</sub> = 0,45.

#### Caractérisation de l'inositol par la réaction de Scherer

100 mg. de la fraction hydrosoluble sont déphosphorylés par chauffage dans un tube scellé avec 2 cm<sup>3</sup> d'ammoniaque à 10 % pendant 24 heures à 110°. Ensuite le produit est filtré, le filtrat amené à sec et repris par 1 cm<sup>3</sup> d'eau; la solution aqueuse est précipitée par l'alcool. Après centrifugation nous obtenons 60 mg. de substance visqueuse et hygroscopique.

20 mg. de ce produit sont oxydés selon Scherer par l'acide nitrique fumant. On ajoute ensuite une goutte de nitrate mercurique et "une pointe de spatule" d'acétate de baryum. On chauffe à sec : il apparaît la coloration rouge caractéristique de rhodizonate de baryum.

### Identification des acides aminés

8 g de phosphatide sont chauffés à 110° dans un tube scellé avec 40 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique 6 N pendant 6 heures. Les acides gras sont extraits à l'éther et la phase aqueuse est filtrée pour enlever les matières humiques. Le filtrat est débarrassé de l'acide chlorhydrique par évaporations répétées sous vide. La chromatographie descendante d'une fraction de cet hydrolysate sur papier Whatman N° 1 dans le phénol saturé d'eau contenant 1 % d'ammoniaque, dans le phénol contenant du tampon phosphate pH 4 selon Mc Farren (158) et dans le butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) (révélation à la ninhydrine), nous a permis d'identifier les acides glutamique et aspartique, l'alanine, la proline, le glycolle et l'ornithine. Le reste de l'hydrolysate est chromatographié sur Dowex 50 (350-400 mesh), colonne de 24 x 130 mm, sous forme de sel d'ammonium. La résine est lavée au préalable avec l'acide chlorhydrique 2 N, ensuite avec de l'eau jusqu'à neutralité, puis avec l'ammoniaque 2 N et encore avec de l'eau jusqu'à neutralité. On verse l'hydrolysate en solution aqueuse sur la colonne qu'on élue d'abord avec de l'eau, puis avec de l'ammoniaque diluée. Les fractions recueillies sont de 50 cm<sup>3</sup>. Les éluats sont soumis au fur et à mesure à l'électrophorèse sur papier Whatman N° 1 dans le tampon véronal-véronal-sodique à pH 8,4 pendant deux heures à 300 volts 1,5 milliampères. La révélation est effectuée par la ninhydrine. La présence de sucres réducteurs dans les éluats est détectée par la liqueur de Fehling.

TABLEAU 6

| Solvant                   | Fraction | Acides aminés                            | Sucres réducteurs |
|---------------------------|----------|------------------------------------------|-------------------|
| Eau                       | 1-3      | acide aspartique<br>coloration violacée  | +                 |
|                           |          | acide glutamique<br>coloration pourpre   |                   |
|                           | 4-22     | acides dicarboxyliques<br>acides neutres | +                 |
|                           | 23-24    | acides neutres                           | -                 |
| NH <sub>4</sub> OH 0,01 N | 25-29    | acides neutres                           | -                 |
| NH <sub>4</sub> OH 0,1 N  | 30-31    | acides neutres                           | -                 |
|                           | 32       | acides neutres (traces)<br>ornithine     | -                 |
| NH <sub>4</sub> OH N      | 33-37    | ornithine                                | -                 |

### Dipicrate d'ornithine

Les fractions 33 et 34, contenant 15 mg d'ornithine (substance visqueuse, jaune, hygroscopique), sont dissoutes dans 0,5 cm<sup>3</sup> d'eau et additionnées de 60 mg d'acide picrique dans 1 cm<sup>3</sup> d'eau. Après deux recristallisations dans l'alcool aqueux nous obtenons le dipicrate d'ornithine F. 205-209°. Nous avons également préparé le dipicrate d'ornithine authentique (produit Hoffmann Laroche), F. 207-208°, fusion du mélange : 205-208°.

### Inhomogénéité du phospholipide étudié

#### Chromatographie des phosphatides de M. phlei

15 g de phospholipides sont dissous dans 100 cm<sup>3</sup> de chloroforme et chromatographiés sur 300 g d'acide silicique préalablement activé, mélangé avec 150 g de célite. Elution par gradient de méthanol dans le chloroforme. Le gradient d'élution est réalisé de la façon suivante : le flacon, placé sur un agitateur magnétique, est relié par une tubulure latérale avec la colonne. Il contient 500 cm<sup>3</sup> de solvant qui s'enrichit progressivement en méthanol à l'aide d'une ampoule à brome fixée au-dessus du flacon. Un litre de chloroforme n'élue rien. Ensuite, des fractions de 100 cm<sup>3</sup> sont recueillies.

| N° | Solvant inférieur<br>(flacon)               | Solvant supérieur<br>(ampoule à brome)      | Poids<br>en mg | F.       |
|----|---------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------|----------|
| 1  | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (9:1) | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (8:2) | 0              |          |
| 2  |                                             | "                                           | 0              |          |
| 3  |                                             | "                                           | 0              |          |
| 4  |                                             | "                                           | 196 mg         |          |
| 5  |                                             | "                                           | 623 mg         | 62-70°   |
| 6  |                                             | "                                           | 332 mg         |          |
| 7  |                                             | "                                           | 131 mg         |          |
| 8  |                                             | "                                           | 87 mg          |          |
| 9  |                                             | "                                           | 76 mg          |          |
| 10 |                                             | "                                           | 78 mg          |          |
| 11 | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (7:3) |                                             | 117 mg         |          |
| 12 |                                             | "                                           | 125 mg         | 191-194° |
| 13 |                                             | "                                           | 315 mg         | 202-205° |
| 14 |                                             | "                                           | 604 mg         | 212-215° |
| 15 |                                             | "                                           | 351 mg         | 202-205° |
| 16 |                                             | "                                           | 275 mg         | 191-193° |
| 17 |                                             | "                                           | 230 mg         |          |
| 18 |                                             | "                                           | 242 mg         |          |
| 19 |                                             | "                                           | 198 mg         | 199-201° |
| 20 |                                             | "                                           | 116 mg         |          |

| N° | Solvant inférieur<br>(flacon) | Solvant supérieur<br>(ampoule à brome)                                                  | Poids<br>en mg | F.       |
|----|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------|
| 21 |                               | $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (1:1)                                              | 74 mg          |          |
| 22 |                               | "                                                                                       | 263 mg         |          |
| 23 |                               | "                                                                                       | 494 mg         | 205-207° |
| 24 |                               | "                                                                                       | 388 mg         | 198-200° |
| 25 |                               | "                                                                                       | 310 mg         |          |
| 26 |                               | "                                                                                       | 248 mg         |          |
| 27 |                               | "                                                                                       | 208 mg         |          |
| 28 |                               | "                                                                                       | 200 mg         |          |
| 29 |                               | "                                                                                       | 205 mg         |          |
| 30 |                               | "                                                                                       | 228 mg         |          |
| 31 |                               | $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-éther}$<br>(4,5:4,5:1)                               | 335 mg         |          |
| 32 |                               | "                                                                                       | 483 mg         |          |
| 33 |                               | "                                                                                       | 519 mg         | 214-219° |
| 34 |                               | "                                                                                       | 497 mg         |          |
| 35 |                               | "                                                                                       | 477 mg         |          |
| 36 |                               | "                                                                                       | 334 mg         |          |
| 37 |                               | "                                                                                       | 332 mg         |          |
| 38 |                               | "                                                                                       | 254 mg         |          |
| 39 |                               | "                                                                                       | 186 mg         |          |
| 40 |                               | "                                                                                       | 137 mg         |          |
| 41 |                               | $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-}$<br>$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (1:1:0, 50 %) | 98 mg          |          |
| 42 |                               | "                                                                                       | 102 mg         |          |
| 43 |                               | "                                                                                       | 118 mg         |          |
| 44 |                               | "                                                                                       | 174 mg         |          |
| 45 |                               | "                                                                                       | 148 mg         |          |
| 46 |                               | "                                                                                       | 134 mg         |          |
| 47 |                               | "                                                                                       | 118 mg         |          |
| 48 |                               | "                                                                                       | 91 mg          |          |
| 49 |                               | "                                                                                       | 122 mg         | 198-200° |
| 50 |                               | "                                                                                       | 118 mg         |          |
| 51 |                               | $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$<br>$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{H}$ (9:1:3 %)      | 103 mg         |          |
| 52 |                               | "                                                                                       | 122 mg         |          |
| 53 |                               | "                                                                                       | 136 mg         |          |
| 54 |                               | "                                                                                       | 110 mg         |          |
| 55 |                               | "                                                                                       | 98 mg          |          |
| 56 |                               | "                                                                                       | 63 mg          |          |
| 57 |                               | "                                                                                       | traces         |          |
|    |                               |                                                                                         | 11 923 mg      |          |

Les propriétés des différentes fractions de cette chromatographie sont indiquées dans le tableau 5 (p. ).

Nous avons rechromatographié la fraction 14 dans les conditions suivantes :

95 mg sont dissous dans 5 cm<sup>3</sup> de chloroforme et la solution versée sur une colonne composée de 2 g d'acide silicique (activé) et de 1 g de célite. Elutions de 10 cm<sup>3</sup> également par gradient de méthanol dans le chloroforme.

| N° | Solvant inférieur                           | Solvant supérieur                           | Poids  | F.       |
|----|---------------------------------------------|---------------------------------------------|--------|----------|
| 1  | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (9:1) | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (8:2) | 0      |          |
| 2  |                                             | "                                           | 0      |          |
| 3  |                                             | "                                           | 0      |          |
| 4  |                                             | "                                           | 0      |          |
| 5  |                                             | "                                           | traces |          |
| 6  |                                             | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (7:3) | 11 mg  | 212-214° |
| 7  |                                             | "                                           | 19 mg  | 212-215° |
| 8  |                                             | "                                           | 29 mg  | 212-215° |
| 9  |                                             | "                                           | 22 mg  | 212-215° |
| 10 |                                             | "                                           | 12 mg  | 212-215° |
|    |                                             |                                             | 93 mg  |          |

La fraction 23 a été rechromatographiée également :

100 mg sont dissous dans 5 cm<sup>3</sup> de chloroforme et mis sur colonne comme plus haut.

| N° | Solvant inférieur                           | Solvant supérieur                           | Poids  | F.       |
|----|---------------------------------------------|---------------------------------------------|--------|----------|
| 1  | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (8:2) | CHCl <sub>3</sub> -OH (7:3)                 | 0      |          |
| 2  |                                             | "                                           | 0      |          |
| 3  |                                             | "                                           | 0      |          |
| 4  |                                             | "                                           | traces |          |
| 5  |                                             | "                                           | 8 mg   |          |
| 6  |                                             | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (1:1) | 14 mg  | 205-207° |
| 7  |                                             | "                                           | 48 mg  | 205-207° |
| 8  |                                             | "                                           | 19 mg  | 205-207° |
| 9  |                                             | "                                           | 6 mg   |          |
|    |                                             |                                             | 95 mg  |          |

La chromatographie du mélange de 100 mg des fractions 14 et 23 (50 mg de la fraction 14 et 50 mg de la fraction 23) nous donne de nouveau deux pics d'élution.

100 mg de produit sont chromatographiés sur 3 g de mélange acide silicique-célicité (2:1). Les fractions recueillies sont de 10 cm<sup>3</sup>.

| N° | Solvant inférieur                           | Solvant supérieur                           | Poids | F.       |
|----|---------------------------------------------|---------------------------------------------|-------|----------|
| 1  | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (8:2) | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (7:3) | 0     |          |
| 2  |                                             | "                                           | 0     |          |
| 3  |                                             | "                                           | 5 mg  |          |
| 4  |                                             | "                                           | 41 mg | 212-215° |
| 5  |                                             | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (7:3) | 2 mg  |          |
| 6  |                                             | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (1:1) | 2 mg  |          |
| 7  |                                             | "                                           | 3 mg  |          |
| 8  |                                             | "                                           | 12 mg |          |
| 9  |                                             | "                                           | 34 mg | 205-207° |
| 10 |                                             | "                                           | 0 mg  |          |
|    |                                             |                                             | 99 mg |          |



## CHAPITRE II

### LA CHIMIE DES PHOSPHOLIPIDES D'UNE SOUCHE H-37 Rv STREPTOMYCINO-RESISTANTE

#### Chromatographie du phosphatide brut

7,5 g de phosphatide sont chromatographiés sur 135 g d'acide silicique + célite (2:1) avec élution par un gradient de méthanol dans le chloroforme, réalisé comme plus haut.

450 cm<sup>3</sup> de chloroforme n'éluent rien. Ensuite on recueille des fractions de 45 cm<sup>3</sup>.

| N° | Solvant inférieur<br>(flacon)                | Solvant supérieur<br>(ampoule)                     | Poids<br>en mg |
|----|----------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------|
| 1  | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (19:1) | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (9:1)        | 0              |
| 2  |                                              | "                                                  | 0              |
| 3  |                                              | "                                                  | 0              |
| 4  |                                              | "                                                  | 0              |
| 5  |                                              | "                                                  | 0              |
| 6  |                                              | "                                                  | traces         |
| 7  |                                              | "                                                  | traces         |
| 8  |                                              | "                                                  | 133 mg         |
| 9  |                                              | "                                                  | 434 mg         |
| 10 |                                              | "                                                  | 625 mg         |
| 11 |                                              | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH<br>(8,5:1,5) | 1229 mg        |
| 12 |                                              | "                                                  | 1033 mg        |
| 13 |                                              | "                                                  | 672 mg         |
| 14 |                                              | "                                                  | 443 mg         |
| 15 |                                              | "                                                  | 178 mg         |
| 16 |                                              | "                                                  | 72 mg          |
| 17 |                                              | "                                                  | 55 mg          |
| 18 |                                              | "                                                  | 40 mg          |
| 19 |                                              | "                                                  | 74 mg          |
| 20 |                                              | "                                                  | 60 mg          |

| N° | Solvant inférieur<br>(flacon) | Solvant supérieur<br>(ampoule)                                                                 | Poids<br>en mg  |
|----|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 21 |                               | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (1:1)                                                    | 44 mg           |
| 22 |                               | "                                                                                              | 83 mg           |
| 23 |                               | "                                                                                              | 50 mg           |
| 24 |                               | "                                                                                              | 57 mg           |
| 25 |                               | "                                                                                              | 49 mg           |
| 26 |                               | "                                                                                              | 47 mg           |
| 27 |                               | "                                                                                              | 38 mg           |
| 28 |                               | "                                                                                              | 56 mg           |
| 29 |                               | "                                                                                              | 60 mg           |
| 30 |                               | "                                                                                              | 62 mg           |
| 31 |                               | CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH-éther<br>-CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H (1:1:1 + 2%) | 152 mg          |
| 32 |                               | "                                                                                              | 126 mg          |
| 33 |                               | "                                                                                              | 100 mg          |
| 34 |                               | "                                                                                              | 109 mg          |
| 35 |                               | "                                                                                              | 140 mg          |
| 36 |                               | "                                                                                              | 86 mg           |
|    |                               |                                                                                                | 6 307 mg ± 83 % |

#### Acide phosphatidique

4 g de phospholipide provenant des fractions 9 à 15 réunies, F. 182-183°, sont dissous dans 35 cm<sup>3</sup> de chloroforme et additionnés de 35 cm<sup>3</sup> de méthanol, il se forme un précipité abondant de phosphatide que l'on sépare par centrifugation (6000 tours/minute). Après évaporation à sec des eaux-mères sous vide on obtient 1,5 g de produit jaunâtre que l'on purifie par chromatographie sur 45 g. d'acide silicique Merck-célite (5:4, colonne de 4 cm de diamètre). Elutions de 180 cm<sup>3</sup>.

|                           |      |        |
|---------------------------|------|--------|
| 1. Chloroforme. . . . .   |      | 0      |
| 2. Chloroforme + méthanol | 19:1 | 380 mg |
| 3. Chloroforme + méthanol | 9:1  | 756 mg |
| 4. Chloroforme + méthanol | 8:2  | 175 mg |
| 5. Chloroforme + méthanol | 7:3  | traces |
| 6. Chloroforme + méthanol | 1:1  | 82 mg  |
| 7. Chloroforme + méthanol | 1:1  | 27 mg  |
| 8. Chloroforme + méthanol | 1:1  |        |
| + 1 % acide acétique      |      | 0      |

1 420 mg

Les fractions 2, 3 et 4 sont réunies. La substance se présente sous forme d'une poudre amorphe très légèrement colorée, F. 161-164° Teneur en glycérol : 12,5 % (calculé pour  $C_{37}H_{71}O_8P$  Mg : 13,1 %).

#### Analyse

$C_{37}H_{71}O_8P$  Mg calculé % C 63,61 H 10,17 P 4,4  
trouvé % C 63,21 H 10,50 P 4,2 cendres 8,36  
C 63,64 H 10,03 P 4,28 cendres 8,66

La chromatographie descendante de cette substance sur papier Whatman N° 1 dans le phénol saturé d'eau, pendant 18 heures à 22°, et la révélation par le réactif permettent de déceler une seule tache,  $R_f = 0,85$ .

#### Préparation de l'acide phosphatidique libre

200 mg d'acide phosphatidique, F. 164°, sont mis en suspension dans l'éther et lavés avec l'acide chlorhydrique N. La phase étherée contient 160 mg d'acide phosphatidique fondant à 48-51°, P = 3,35 %. Calculé pour  $C_{37}H_{73}O_8P$  : 4,44 %.

#### Hydrolyse alcaline ménagée

500 mg d'acide phosphatidique sont dissous dans 5 cm<sup>3</sup> de benzène et additionnés de 0,5 cm<sup>3</sup> de potasse éthylique à 15 %. Après 24 heures à la température ambiante, on obtient 74 % d'acides gras et une partie hydrosoluble.

#### Identification des acides gras

Les acides gras fondent à 58-61°, leur poids moléculaire moyen déterminé par titrage est de 272. Nous avons mesuré leur indice d'iode par la microméthode de Rosenmund-Kuhnhenh modifiée par Yasuda (159):

12 mg d'acides gras sont dissous dans 2 cm<sup>3</sup> d'acide acétique et additionnés de 10 cm<sup>3</sup> de réactif halogénant (sulfate de dibromopyridine). On laisse 30 minutes à l'obscurité, ajoute 5 cm<sup>3</sup> de solution d'iodure de potassium à 2 % et titre avec du thiosulfate N/20. On effectue parallèlement le dosage "à blanc" avec les réactifs seuls et le dosage d'acide oléique commercial.

Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

TABEAU 7

| Substance            | Poids en mg. | Thiosulfate N/20 en cm <sup>3</sup> | Indice d'iode trouvé | Indice d'iode calculé |
|----------------------|--------------|-------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| Témoin blanc         |              | 7,5                                 |                      |                       |
| Acides gras F. 58-61 | 12           | 7,5                                 | nul                  |                       |
| Acide oléique        | 10,8         | 6                                   | 88                   | 89                    |

Il n'y a pas d'absorption de lumière à 220 m $\mu$ .

L'ester méthylique préparé par action du diazométhane sur les acides gras et distillation fond à 26-29°; son analyse élémentaire indique qu'il s'agit d'un mélange de palmitate et de stéarate de méthyle.

#### Analyse

|                                                            |         |         |                       |
|------------------------------------------------------------|---------|---------|-----------------------|
| C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> calculé % : | C 75,50 | H 12,67 | OCH <sub>3</sub> 5,5  |
| C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> calculé % : | C 75,45 | H 12,72 | OCH <sub>3</sub> 5,04 |
| trouvé % :                                                 | C 75,80 | H 12,43 | OCH <sub>3</sub> 5,10 |
|                                                            | C 76,02 | H 12,48 | OCH <sub>3</sub> 5,03 |

#### Examen de la partie hydrosoluble

La partie hydrosoluble a été soumise à une chromatographie ascendante sur papier Whatman N° 4 pendant 4 heures 30 minutes dans le système solvant suivant : acétone-méthanol-acide trichloracétique à 20 % (65:25:30) et à une chromatographie ascendante sur papier Whatman N° 1 pendant 6 heures, dans le méthanol-acide formique-eau (80:15:5) selon Bandurski et Axelrod (149). Révélation par le réactif molybdique. Dans les deux solvants, le R<sub>f</sub> de la partie hydrosoluble est le même que celui de l'acide glycérophosphorique, 0,82 et 0,55 respectivement.

L'oxydation periodique sur papier selon Metzenberg et Mitchell (103) permet d'identifier l'acide  $\alpha$ -glycérophosphorique. La partie hydrosoluble est chromatographiée par la méthode ascendante sur papier Whatman N° 4, dans le mélange méthanol-acide formique-eau (80:15:5). Ensuite on asperge la feuille avec une solution de periodate de potassium 0,01 M. Après séchage à l'air pendant 10 minutes on vaporise une solution de tampon borique contenant de l'iodure de potassium et de l'amidon. Une tache blanche sur fond bleu-violet apparaît au niveau correspondant à l'acide  $\alpha$ -glycérophosphorique; l'acide  $\beta$ -glycérophosphorique ne réagit pas avec le periodate et n'est pas révélé.

Nous avons également isolé l'acide glycérophosphorique à l'état de son sel de baryum. 50 mg de l'hydrosoluble dissous dans 1 cm<sup>3</sup> d'eau sont additionnés d'une solution de baryte. On précipite ensuite le sel de baryum formé par l'alcool absolu.

#### Analyse

|                                                                                |         |        |               |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------|--------|---------------|
| C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> P Ba.H <sub>2</sub> O calculé % : | C 11,07 | H 2,76 | cendres 69,04 |
| trouvé % :                                                                     | C 10,75 | H 2,65 | cendres 69,8  |

L'analyse élémentaire du glycérophosphate de baryum indique que nous avons isolé l'acide  $\beta$ -glycérophosphorique qui cristallise avec une molécule d'eau.

#### Incubation avec Polidase S.

65 mg de l'hydrosoluble sont additionnés de 2,3 cm<sup>3</sup> de solution d'acétate d'ammonium à pH 7 et de 2,3 cm<sup>3</sup> de solution aqueuse de Polidase S préalablement dialysée. On laisse en contact à 37° pendant 4 heures. Ensuite la solution est concentrée et chromatographiée sur papier Whatman N° 4, technique ascendante, dans le méthanol-acide

formique-eau (80:15:5), révélation par le réactif molybdique; et sur papier Whatman N° 1, technique descendante, dans l'isopropanol-acide acétique-eau (6:3:1), révélation par l'acide periodate-benzidine. Nous identifions le glycérol et le phosphore.

### Phosphatidyl-inosito-dimannoside

#### Préparation du phosphatide

2,5 g du précipité séparé de l'acide phosphatidique ont été soumis deux fois à un traitement par le chloroforme-méthanol (3:2) à 40° pendant 2 minutes. 1,9 g de substance insoluble se présentent sous forme d'une poudre incolore, F. 209-210°, ( $\alpha$ )<sub>D</sub> = + 34° (c = 1,1 chloroforme), contenant 2,45 % de phosphore, 27,1 % de sucres réducteurs, 7,6 % de glycérol, 13,1 % d'inositol. Calculé pour (C<sub>55</sub>H<sub>102</sub>O<sub>23</sub>P)<sub>2</sub> Mg : 2,6 % de phosphore, 30,7 % de mannose, 7,8 % de glycérol, 15,3 % d'inositol (\*).

#### Analyse

(C<sub>55</sub>H<sub>102</sub>O<sub>23</sub>P) Mg calculé % : C 56,26    H 8,69  
trouvé % : C 56,79 (\*) H 9,53 (\*) cendres 4,59

#### Saponification alcaline; identification des acides gras

1,6 g de la substance F. 209-210° sont soumis à l'hydrolyse alcaline ménagée (comme ci-dessus). Après 24 heures, nous obtenons 700 mg d'acides gras : 44 %, F. 56-60°. Le poids moléculaire moyen obtenu par titrage est de 270. L'indice d'iode est nul; il n'y a pas d'absorption ultraviolette. L'analyse élémentaire montre que là aussi nous avons affaire à un mélange d'acides palmitique et stéarique.

#### Analyse

C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> calculé % : C 74,94    H 12,58  
C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub> calculé % : C 75,99    H 12,76  
trouvé % : C 75,36    H 12,70

#### Chromatographie sur papier

Nous avons pu identifier le mélange d'acides étudiés par chromatographie sur papier Whatman N° 1 imprégné d'huile de paraffine selon Ceccaldi, Wegmann et Biez-Charreton (107). La feuille de papier est immergée pendant 5 minutes dans le benzène contenant 15 % de Nujol, puis essorée entre deux feuilles de papier filtre et séchée à plat à la température ambiante. La chromatographie descendante (20 heures) est effectuée dans le méthanol à 90 % saturé de Nujol. La cuve est saturée de vapeurs de solvant avant la mise en place de la feuille. La révéla-

(\*) L'écart par rapport à la théorie peut s'expliquer par la présence d'environ 5% d'acide phosphatidique dans le phosphatidyl-inosito-dimannoside.

tion se fait par pulvérisations successives d'acétate de cuivre en solution à 1 % et de Rhodamine B (\*) en solution à 0,1%. Dans l'ultraviolet on voit apparaître deux taches violettes sur fond rouge : Rf : 0,45 et 0,20. correspondant respectivement aux acides palmitique et stéarique.

#### Analyse de la fraction hydrosoluble

La partie hydrosoluble contient 4,6 % de phosphore, 49,3 % de mannose, 25,7 % d'inositol et 13,8 % de glycérol. Cette fraction, chromatographiée sur papier Whatman N° 4, méthode ascendante, pendant 3 heures 30 dans l'acétone-méthanol-acide trichloracétique à 20 % (65:25:40), donne deux taches révélables par le réactif molybdique : Rf = 0,5 et 0,79; la première correspond au dimannoside de glycérophosphate d'inositol, la seconde à l'acide glycérophosphorique. Les dosages de phosphore effectués sur les éluats montrent que le phosphatidyl-inositol-dimannoside contient au maximum 5 % d'acide phosphatique.

#### Hydrolyse acide de la fraction hydrosoluble

500 mg de la partie hydrosoluble sont chauffés à reflux avec 5 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique à 5 % pendant 5 heures. Ensuite la solution est neutralisée par agitation avec de l'Amberlite IR 4B et concentrée sous vide.

#### Identification du D-mannose et de l'inositol.

Une partie de la solution aqueuse contenant environ 200 g de sucres réducteurs est chromatographiée sur papier Whatman N° 1 dans les deux systèmes suivants :

- a) Phénol saturé d'eau contenant 1 % d'ammoniaque en présence de cyanure de potassium (18 heures).
- b) Butanol saturé d'eau contenant 10 % d'acide acétique pendant 24 heures.

Les deux chromatographies sont descendantes; révélation par le phthalate acide d'aniline.

Dans les deux solvants le Rf du sucre correspond à celui du mannose a) Rf = 0,46; b) Rf = 0,21.

Une partie de cette solution a été chromatographiée sur papier Whatman N° 1 pendant 24 heures dans l'isopropanol-acide acétique-eau (6:3:1), technique descendante; révélation à l'acétate d'uranyle. Nous obtenons une tache dont le Rf est identique à celui de l'inositol témoin, Rf = 0,18.

#### Isolement de la phénylhydrazone de D-mannose

Le reste de la solution provenant de l'hydrolyse acide est chauffé 1 minute avec 0,5 g de phénylhydrazine dans 1 cm<sup>3</sup> d'alcool. Les cristaux obtenus après recristallisation dans l'alcool aqueux se présentent

(\*) Produit fabriqué par la Société des Matières Colorantes de St-Denis.

sous forme de paillettes incolores (320 mg); F. 193-194° (litt. : 194-195°); ( $\alpha_D$ ) = + 28,2° (C = 0,5 pyridine). Le point de fusion du mélange avec la phénylhydrazone du mannose authentique est 192-194°.

#### Analyse

|                      |           |           |        |         |
|----------------------|-----------|-----------|--------|---------|
| $C_{12}H_{18}O_5N_2$ | calculé % | : C 53,32 | H 6,71 | N 10,37 |
|                      | trouvé %  | : C 53,37 | H 6,75 | N 10,87 |

#### Isolement du méso-inositol

100 mg de phosphatide intact sont mis en suspension dans 1 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique 6 N et chauffés à 110° dans un tube scellé pendant 8 heures. Les acides gras sont ensuite extraits par l'éther et la solution neutralisée et désionisée successivement par les Amberlites IR 4B et IRC 50. La solution aqueuse est concentrée sous vide à 0,5 cm<sup>3</sup> et additionnée d'éthanol jusqu'à l'apparition d'un trouble; la cristallisation s'amorce à la température ambiante. Le méso-inositol recristallisé dans l'alcool aqueux fond à 221-222°, ainsi que son mélange avec le méso-inositol authentique.

#### Hydrolyse acide ménagée de la fraction hydrosoluble

150 mg de la partie hydrosoluble sont chauffés à reflux dans 1 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique N pendant 20 minutes. On chasse l'acide sous vide et on effectue une chromatographie ascendante sur papier Whatman N° 4 pendant 4 heures 30. Solvant : acétone-méthanol-acide trichloracétique à 20 % (65:25:30). Révélation au réactif molybdique. Exposition de la feuille à la lumière U.V. L'hydrolysate donne deux taches : l'une au niveau du mono-phosphate d'inositol,  $R_f = 0,69$  (\*), et la deuxième au niveau de l'acide glycérophosphorique,  $R_f = 0,82$ . Cependant, la substance correspondant au monophosphate d'inositol, élue du papier, contient du glycérol.

Nous avons alors cherché d'autres solvants permettant de distinguer le phosphate d'inositol et le glycérophosphate d'inositol. En utilisant le papier Whatman N° 4 en chromatographie ascendante pendant 3 heures 30 avec le système méthanol-acide formique-eau (80:15:5), nous trouvons : phosphate d'inositol  $R_f = 0,49$ , acide glycérophosphorique  $R_f = 0,73$ . La partie hydrosoluble, hydrolysée comme ci-dessus, donne trois taches :  $R_f = 0,43$  (glycérophosphate d'inositol),  $R_f = 0,49$  (phosphate d'inositol) et  $R_f = 0,73$  (acide glycérophosphorique). Dans le mélange isopropanol-ammoniaque-eau (6:3:1), la tache du glycérophosphate d'inositol a également un  $R_f$  légèrement différent de celui du monophosphate d'inositol.

Nous avons chromatographié la même solution (provenant de l'hydrolyse acide ménagée) sur papier Whatman N° 1 dans le mélange isopropanol-acide acétique-eau (6:3:1) avec révélation au moyen d'acide périodique-benzidine et trouvons du mannose, de l'inositol et du glycérol à l'état libre.

---

(\*) Nous avons utilisé le 2-monophosphate d'inositol aimablement mis à notre disposition par M. A. Desjobert.

## Déphosphorylation

250 mg de produit hydrosoluble sont dissous dans 4 cm<sup>3</sup> d'ammoniaque à 14 % et chauffés dans un tube scellé à 170° pendant 8 heures (\*). La solution est ensuite filtrée et l'ammoniaque, en grande partie, chassé sous vide. Le résidu est additionné de quelques centimètres cubes d'eau et la solution aqueuse désionisée par agitation avec de l'Amberlite MB 3. Le filtrat est concentré et le sirop obtenu précipité par l'alcool absolu. L'inosito-dimannoside ainsi préparé, ( $\alpha$ )<sub>J</sub> = + 76,7° (C = 1,33, eau), se présente sous forme d'une poudre incolore, amorphe, qui se décompose vers 260° ; il contient 68 % de sucres réducteurs et 34,2 % d'inositol.

## Préparation de l'acétate

110 mg de l'inosito-dimannoside sont mis en suspension dans 3 cm<sup>3</sup> de pyridine sèche et 1 cm<sup>3</sup> d'anhydride acétique. Après 72 heures de contact à la température ambiante la solution est entièrement homogène. On la concentre sous vide, ajoute un peu d'acide sulfurique dilué et l'extrait au chloroforme. Après évaporation, sous vide, de la solution chloroformique nous obtenons 200mg de produit amorphe qui fond à 108-110° (chauffage rapide).

150 mg de cet acétate sont dissous dans 5 cm<sup>3</sup> de benzène et chromatographiés sur 4,2 g. de trisilicate de magnésium+célite (2:1); éluions de 15 cm<sup>3</sup>.

|                              |       |               |
|------------------------------|-------|---------------|
| 1. Benzène . . . . .         | 0     |               |
| 2. Benzène-éther (3:1). . .  | 0     |               |
| 3. Benzène-éther (1:1). . .  | 2 mg  |               |
| 4. Benzène-éther (1:1). . .  | 3 mg  |               |
| 5. Ether . . . . .           | 9 mg  |               |
| 6. Ether . . . . .           | 11 mg | F. 133-135°   |
| 7. Ether . . . . .           | 6 mg  |               |
| 8. Ether-éthanol (19:1) . .  | 28 mg | } F. 136-138° |
| 9. Ether-éthanol (19:1) . .  | 33 mg |               |
| 10. Ether-éthanol (19:1) . . | 5 mg  |               |
| 11. Ether-éthanol ( 9:1) . . | 4 mg  |               |
| 12. Ethanol. . . . .         | 2 mg  |               |
| 13. Ethanol. . . . .         | 12 mg | } F. 125-130° |
| 14. Ethanol-acétone (19:1) . | 10 mg |               |
| 15. Ethanol-acétone (19:1) . | 3 mg  |               |

128 mg

Les fractions 8 et 9 réunies sont recristallisées dans l'éthanol, on obtient une poudre incolore, microcristalline, F. 136-138° ( $\alpha$ )<sub>J</sub> = + 52° (C = 1,33, méthanol).

|                |                                                 |             |         |        |
|----------------|-------------------------------------------------|-------------|---------|--------|
| <u>Analyse</u> | C <sub>42</sub> H <sub>56</sub> O <sub>28</sub> | calculé % : | C 50,00 | H 5,55 |
|                |                                                 | trouvé % :  | C 50,20 | H 5,78 |

(\*) Nous effectuons cette opération dans un four à tube scellé de Hösli Bischofszell (Suisse).

#### Méthylation du phosphate intact selon Kuhn, Trischmann et Löw (112)

Le phosphatidyl-inosito-dimannoside étant insoluble dans la diméthylformamide, nous dissolvons 500 mg de produit dans 5 cm<sup>3</sup> d'éther et ajoutons 5 cm<sup>3</sup> de diméthylformamide. Cette solution est ensuite additionnée de 2,5 cm<sup>3</sup> d'iodure de méthyle et 2 mg d'oxyde d'argent fraîchement préparé (réactif de Purdje) ajouté en deux fois à 10 minutes d'intervalle. La température est maintenue pendant 24 heures à 30° et le milieu réactionnel agité sans interruption. Après 24 heures on ajoute encore une fois les mêmes quantités de réactifs et on laisse en contact 48 heures en continuant l'agitation. Ensuite on effectue une troisième addition : 2 cm<sup>3</sup> d'iodure de méthyle et 1,5 d'oxyde d'argent. Au bout de 24 heures on essore l'abondant précipité d'iodure d'argent formé. Le filtrat est additionné de 50 cm<sup>3</sup> de solution aqueuse de cyanure de potassium à 3 % destinée à détruire le complexe formé entre l'iodure d'argent et la diméthylformamide (160). La solution aqueuse est extraite par le chloroforme. La phase chloroformique évaporée à sec fournit 510 mg de produit dont le spectre I.R. montre la présence d'une bande hydroxyle à 2,85  $\mu$ . Nous avons soumis cette substance à un traitement supplémentaire par l'iodure de méthyle et l'oxyde d'argent mais le phosphatide obtenu n'était toujours pas entièrement méthylé.

#### Méthylation des phospholipides d'après Okuhara et Nakayama (44)

300 mg de phosphatidyl-inosito-dimannoside sont dissous dans 30 cm<sup>3</sup> de chloroforme et additionnés de 4,5 cm<sup>3</sup> d'iodure de méthyle et de 4,5 g d'oxyde d'argent. On chauffe le mélange à 30° en agitant énergiquement pendant 3 heures, ensuite on le fait bouillir à reflux pendant 18 heures. On répète l'opération cinq fois en ajoutant chaque fois 3 cm<sup>3</sup> d'iodure de méthyle et 3 g d'oxyde d'argent. Puis on filtre le précipité d'iodure d'argent, on le lave abondamment avec le chloroforme et concentre sous vide; on obtient 270 mg de produit visqueux, jaune pâle, soluble dans l'éther, dont le spectre infrarouge présente une forte bande hydroxyle.

Etant donné la faible quantité de phospholipides, nous avons interrompu ces essais.



## CHAPITRE III

### LES PHOSPHOLIPIDES DU BACILLE CALMETTE-GUERIN (BCG).

#### A. Etude des phospholipides d'une souche de BCG cultivée sur milieu de Sauton.

##### Nouvelle méthode d'extraction

Les bacilles vivants sont mis en suspension dans l'eau, filtrés et épuisés à l'acétone. Le résidu insoluble dans l'acétone est séché et extrait trois fois pendant 5 heures par le méthanol à 55° (1:6 p/v). Les extraits réunis sont filtrés à chaud et le filtrat abandonné pendant une nuit à 10-15°. Le précipité formé est séparé par filtration et le filtrat concentré sous vide à 30°. Le produit ainsi obtenu est mis en suspension dans l'eau et extrait trois fois à l'éther. L'extrait étheré contient du phosphore (essai qualitatif).

##### Préparation et purification du phosphatide

8 g d'éthérosoluble sont mis en suspension dans 100 cm<sup>3</sup> d'acétone et chauffés à reflux pendant 25 minutes. La solution chaude est filtrée et l'opération répétée encore quatre fois. Le résidu est ensuite dissous dans 75 cm<sup>3</sup> d'éther, la solution étherée filtrée et le filtrat précipité par 150 cm<sup>3</sup> d'acétone. La centrifugation (3800 t/m à -5° permet d'obtenir 5 g. de phospholipide.

Le phospholipide ainsi préparé est ensuite soumis à un lavage selon Folch (115) dans les conditions suivantes :

Un petit bécher de 7 cm<sup>3</sup> est immergé dans un bécher de 50 cm<sup>3</sup> rempli d'eau aux 9/10. 200 mg de phosphatide dissous dans 3 cm<sup>3</sup> de chloroforme et 1,5 cm<sup>3</sup> de méthanol sont introduits à l'aide d'une pipette dans le petit bécher et laissés au repos. Après 48 heures de contact, le volume de la phase organique diminue, le méthanol ayant diffusé dans l'eau. A l'interphase on observe un précipité blanc. On sépare les deux solutions à l'aide d'une pipette. Après évaporation à sec de la solution chloroformique nous récupérons 180 mg de phospholipide contenant 30 % de sucres réducteurs. La phase aqueuse est chromatographiée sur papier Whatman N° 1 dans le butanol-pyridine (45:25:40); révélation par l'acide periodique-benzidine : pas de sucres dans cette fraction.

Nous poursuivons la purification du phosphatidyl-inosito-dimannoside par filtration de sa solution chloroformique sur colonne de cellulose Whatman et le produit obtenu, F. 215-217°, ( $\alpha$ )<sub>D</sub> = + 32° (C=1,4, chloro-

roforme, contient 2,54 % de phosphore, 30 % de sucres réducteurs, 14 % d'inositol et 7,5 % de glycérol. Rappelons que les quantités théoriques calculées pour le phosphatidyl-inosito-dimannoside sont 2,6 % de phosphore, 30,7 % de mannose, 15,3 % d'inositol et 7,8 % de glycérol.

#### Analyse

$(C_{55}H_{102}O_{23}P)_2$  Mg calculé % : C 56,26 H 8,69

trouvé % : C 56,75 H 9,17 cendres 11,4

#### Structure du phosphatidyl-inosito-dimannoside

##### Hydrolyse alcaline et identification des acides gras

5 g de phosphatidyl-inosito-dimannoside soumis à la saponification alcaline ménagée fournissent 2,3 g (46 %) d'acides gras et une partie hydrosoluble.

2 g d'acides gras sont dissous dans 20 cm<sup>3</sup> d'alcool chaud et additionnés de 20 cm<sup>3</sup> de solution alcoolique saturée d'acétate de plomb basique. On laisse cristalliser pendant 48 heures à la température ambiante. Ensuite on essore le précipité formé et on le lave à l'éther et l'alcool froid. Il est constitué par les sels de plomb d'acides gras saturés, insolubles dans l'alcool. Ces sels de plomb sont décomposés par l'acide chlorhydrique à 10 % et les acides extraits à l'éther. L'évaporation de la solution étherée fournit 1,1 g d'acides saturés, solides à la température ambiante. Le filtrat alcoolique contenant les sels de plomb soluble, est concentré sous vide et l'huile obtenue reprise par l'éther et décomposée par l'acide chlorhydrique à 10 %. Nous obtenons 850 mg d'acides gras liquides. Nous préparons les esters méthyliques des acides solides et liquides par action du diazométhane en solution étherée.

##### Analyse des esters des acides solides :

$C_{17}H_{34}O_2$  calculé % : C 75,50 H 12,67  $OCH_3$  5,5

$C_{19}H_{38}O_2$  calculé % : C 76,45 H 12,83  $OCH_3$  5,04

trouvé % : C 76,29 H 12,98  $OCH_3$  5,13

##### Analyse des esters des acides liquides :

$C_{20}H_{40}O_2$  calculé % : C 76,86 H 12,90  $OCH_3$  4,80

trouvé % : C 76,57 H 12,70  $OCH_3$  4,69

##### Chromatographie gaz-liquide des esters méthyliques

Nous avons soumis les deux groupes d'esters à une chromatographie en phase gazeuse avec l'appareil "VPC Mark I" Griffin and George Ltd. Nous avons utilisé 5 à 10 mg de chaque échantillon. La colonne était remplie de célite imprégnée de silicone fluide 550 à 30 %. Température de la colonne et du catharomètre : 275°; pression à l'entrée 668 mm à la sortie 166 mm; débit d'azote : 2,05 litres/heures; vitesse d'enregistrement : 12 m/heure; sensibilité : 120 milliampères. Les esters d'acides saturés donnent deux pics correspondant aux palmitate et stéarate de méthyle. Les trois pics observés dans le cas des esters d'acides liquides correspondant aux acides palmitoléique, octadécénoïque

et tuberculostéarique. Les pics ont été identifiés au moyen d'échantillons authentiques de ces acides. Nous avons traité 10 mg d'esters méthyliques d'acides liquides en solution dans le tétrachlorure de carbone par le brome également dans le tétrachlorure. Après évaporation sous vide de l'excès de brome et de solvant, nous avons soumis les esters bromés à une nouvelle chromatographie en phase gazeuse; seul le pic correspondant à l'acide tuberculostéarique persiste.

#### Identification des constituants hydrosolubles

50 mg de la fraction hydrosoluble, hydrolysée préalablement par chauffage à reflux avec de l'acide sulfurique à 5 % sont chromatographiés sur papier Whatman N° 1 dans les solvants suivants :

A. Butanol-acide acétique-eau (4:1:5), descendante pendant 24 h.

B. Isopropanol-acide acétique-eau (6:3:1), descendante pendant 32 h.

La révélation par le réactif de Partridge montre dans le solvant A une seule tache allongée,  $R_f = 0,19$ ; dans le solvant B : une tache très forte,  $R_f = 0,50$ , correspondant au mannose et une faible,  $R_f = 0,43$ , niveau du glucose témoin.

200 mg de phosphatidyl-inosito-dimannoside ont été hydrolysés dans l'acide chlorhydrique 6 N (les conditions de cette hydrolyse ont été décrites plus haut) et la fraction hydrosoluble chromatographiée sur papier Whatman N° 1 dans l'isopropanol-acide acétique-eau (6:3:1), descendante pendant 30 heures. La révélation par l'acide periodique-benzidine permet de déceler en plus du mannose et du glucose, une tache au niveau de l'inositol,  $R_f = 0,19$ , et une tache correspondant au glycérol,  $R_f = 0,83$ .

A partir de cet hydrolysate chlorhydrique nous avons isolé, selon la technique décrite précédemment, 23 mg de méso-inositol, F. 220-221°.

#### Préparation de l'hexaacétate du méso-inositol

20 mg d'inositol F. 220-221° sont dissous à chaud dans 0,7 cm<sup>3</sup> de pyridine sèche et 0,3 cm<sup>3</sup> d'anhydride acétique. On laisse pendant 72 heures à la température ordinaire. Après acidification par l'acide sulfurique dilué et extraction au chloroforme, nous obtenons 42 mg d'acétate lequel, purifié par cristallisation dans l'alcool, fond à 217-218°; point de fusion du mélange avec un hexaacétate du méso-inositol authentique : 216-218°.

#### Hydrolyse acide ménagée

La fraction hydrosoluble provenant de la saponification alcaline a été chauffée à reflux avec l'acide chlorhydrique N pendant 30 minutes. L'hydrolysate est ensuite chromatographié sur papier Whatman N° 4 ascendante, 4 heures 10 minutes) dans le méthanol-acide formique-eau (85:15:5) et le chromatogramme est révélé par le réactif molybdique et exposé à la lumière U.V. Nous identifions l'acide glycérophosphorique,  $R_f = 0,73$ , le phosphate d'inositol,  $R_f = 0,49$ , et le phosphore minéral,  $R_f = 0,76$  (tache verdâtre, tandis que les composés phosphorylés organiques donnent une coloration bleue).

### Isolement d'un diglycéride

200 mg de phosphatidyl-inosito-dimannoside sont chauffés selon Hanahan (117) dans 5 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique 2 N pendant 20 minutes au bain-marie à 98°. La phase aqueuse est ensuite extraite à l'éther; la solution étherée est lavée à l'eau jusqu'à neutralité, puis au carbonate de soude à 7 %. Après évaporation à sec, elle fournit 35 mg de produit neutre, F. 65-68°, contenant 13,3 % de glycérol; le rapport acides gras/glycérol est de 1,78. (La quantité de glycérol calculée pour un diglycéride contenant des acides gras de poids moléculaire moyen 270 est 15,4 %). Par saponification avec la potasse alcoolique à 5 % nous obtenons les acides gras solides de poids moléculaire 267, F. 56-60°, et une partie hydrosoluble. Cette dernière, chromatographiée sur papier Whatman N° 1 dans l'isopropanol-acide acétique-eau (6:3:1), descendante pendant 28 heures, donne une seule tache au niveau du glycérol, R<sub>f</sub> = 0,80 (révélation par l'acide periodique-benzidine).

### Méthylation du phosphatidyl-inosito-dimannoside selon Okuhara et Nukayama (44).

450 mg de phospholipide sont dissous dans 40 cm<sup>3</sup> de chloroforme et additionnés de 5 cm<sup>3</sup> d'iodure de méthyle et 5 g d'oxyde d'argent fraîchement préparé (réactif de Purdje). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 24 heures avec agitation magnétique. On ajoute ensuite 4,5 cm<sup>3</sup> d'iodure de méthyle et 4 g d'oxyde d'argent et continue le chauffage et l'agitation pendant 48 heures. Le traitement est répété sept fois. Après cinq additions de réactifs, nous avons isolé le produit mais la méthylation n'était pas complète. Après sept traitements successifs on essore le précipité d'argent et on le lave avec du chloroforme. Le filtrat, concentré sous vide, fournit un produit visqueux, jaune, ( $[\alpha]_D^{25} = +14,5^\circ$  (C = 1,38, méthanol), ne contenant pratiquement plus de bande hydroxyle à 2,95  $\mu$ .

### Hydrolyse acide du phosphatide perméthylé.

380 mg de substance sont dissous dans 2 cm<sup>3</sup> de méthanol absolu et additionnés de 8 cm<sup>3</sup> de méthanol contenant 10 % d'acide chlorhydrique gazeux. La solution est chauffée à reflux pendant 8 heures 30 minutes. On l'abandonne ensuite toute la nuit à la glacière; il se forme un précipité composé d'esters méthyliques des acides gras. On les sépare par essorage et le filtrat est débarrassé de l'acide chlorhydrique par plusieurs additions de petites quantités de méthanol et évaporation sous vide. On reprend enfin le résidu par le méthanol à 50 %; on le chasse en chauffant l'émulsion formée et on extrait la phase aqueuse par l'éther de pétrole. Les traces d'esters gras étant ainsi éliminés on obtient la fraction aqueuse contenant les sucres, l'inositol, l'acide phosphorique et le glycérol. La solution est évaporée à sec et le résidu chauffé à reflux pendant 4 heures avec 5 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique aqueux à 5 % afin d'hydrolyser le méthylmannoside formé au cours de l'hydrolyse décrite ci-dessus. La solution acide est désionisée par l'Amberlite IR 4B et évaporée à sec. La chromatographie ascendante sur

papier Whatman N° 1 pendant 17 heures dans le système suivant : éthanol-butanol-ammoniaque-eau (10:40:1:49) et la révélation par le réactif de Partridge permettant d'identifier les triméthyl- et tétraméthylmannoses,  $R_f = 0,84$  et 1.

Les dosages de ces deux méthylhexoses effectués après leur élution du papier indiquent la présence des triméthyl- et tétraméthylmannoses en quantités équimoléculaires.

### Essais d'isolement d'un mannobiose

#### a) Acétolyse

500 mg de phosphatide sont mis en suspension à 0° dans le mélange suivant : 3 cm<sup>3</sup> d'acide acétique, 3 cm<sup>3</sup> d'anhydride acétique et 0,5 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique. Après 72 heures de contact à la température ambiante avec agitation continue, la solution est filtrée et le filtrat versé sur la glace pilée; on ajoute ensuite du bicarbonate de soude jusqu'à pH 4 et on extrait la solution aqueuse au chloroforme. La solution chloroformique est évaporée à sec; le produit obtenu, 600 mg, est repris par 4 cm<sup>3</sup> de chloroforme et 4 cm<sup>3</sup> de méthanol et additionné, à 0°, avec agitation magnétique, d'une solution de méthylate préparée à partir de 110 mg de baryum et 1,5 cm<sup>3</sup> de méthanol absolu. On laisse le mélange réactionnel pendant 20 heures dans ces conditions, puis on neutralise avec l'acide sulfurique dilué et on centrifuge. La solution est évaporée à sec et chromatographiée sur papier Arches N° 304 dans l'isopropanol-acide acétique-eau (6:3:1); technique descendante avec écoulement du solvant en bas de la feuille, 50 heures. La révélation par le réactif molybdique donne une tache sur la ligne de départ et deux autres correspondant à l'acide glycérophosphorique (16 cm) et à l'inositophosphate (12 cm). Les chiffres indiquent la distance entre la ligne de départ et le centre de la tache.

La révélation par l'acide periodique-benzidine fait apparaître des taches correspondant au glycérol (43 cm), au mannose (29 cm), au glucose (25 cm), à l'inositol (10 cm) et au 1-6 mannosido- $\alpha$ -mannose (14); elle donne également une tache allongée sur la ligne de départ.

La révélation par le phtalate d'aniline montre une tache très forte au niveau du mannose (29 cm) et deux faibles correspondant au glucose (25 cm) et au 1-6 mannosido- $\alpha$ -mannose.

#### b) Hydrolyse acide ménagée

500 mg de la fraction hydrosoluble provenant de la saponification alcaline sont dissous dans 10 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique 0,5 N et chauffés pendant 3 heures au bain-marie à 80°. Ensuite la solution est neutralisée par le bicarbonate de soude et concentrée sous vide.

### Chromatographie sur charbon

L'hydrolysats est chromatographié sur 10 g de charbon Darco G 60 mélangé avec 10 g de célite; éluions de 200 cm<sup>3</sup>. La présence de sucres dans les fractions recueillies est décelée par le réactif à l'anthrone.

TABLEAU 8

| Solvant               | Fractions | Substance éluee                                                                                                                                                |
|-----------------------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Eau                   | 1-10      | Mannose libre identifié par chromatographie sur papier                                                                                                         |
| Eau                   | 11-12     | Réaction à l'anthrone très faible                                                                                                                              |
| Eau-éthanol<br>(98:2) | 13-17     | 120 mg de produit, $(\alpha)_D = + 76,5^\circ$ , contient 67,4 % de sucres réducteurs et 32 % d'inositol.<br>ne se révèle pas par le phthalate acide d'aniline |
| Eau-éthanol<br>(98:2) | 18-22     | Traces                                                                                                                                                         |

Nous avons soumis 20 mg de produit provenant des fractions 13-17 à une hydrolyse acide plus énergique : chauffage à reflux pendant 6 heures avec l'acide sulfurique à 5 %. L'hydrolysate obtenu a été chromatographié sur papier Whatman N° 1, en même temps que le produit  $(\alpha)_D = + 76,5^\circ$ , dans l'isopropanol-acide acétique-eau (6:3:1); chromatographie descendante, 24 heures; révélation par l'acide periodique-benzidine. L'hydrolysate (provenant de l'hydrolyse sulfurique) donne deux taches : l'une correspondant à l'inositol,  $R_f = 0,18$ , et la deuxième au niveau du mannose,  $R_f = 0,49$ . Le produit élué du charbon fait apparaître une seule tache,  $R_f = 0,05$ , correspondant à l'inosito-dimannoside.

Le mannobiose ne se forme pas du tout pendant l'hydrolyse.

#### B. Etude des phospholipides d'un lot de BCG cultivé sur milieu peptoné et glycérimé.

##### Analyse préliminaire

1 g de phospholipide de ce nouveau lot a été soumis à la saponification alcaline ménagée comme plus haut.

La fraction hydrosoluble est hydrolysée par chauffage au bain-marie pendant 8 heures avec l'acide sulfurique à 5 %, ensuite désionisée par l'Amberlite IR 4B et chromatographiée sur papier Whatman N° 1 dans l'isopropanol-acide acétique-eau (6:3:1) pendant 62 heures avec écoulement du solvant en bas de la feuille. Les révélations par le phthalate acide d'aniline et par l'acide periodique-benzidine mettent en évidence à côté de l'inositol (10,5 cm), du glycérol (45 cm) et du mannose (29,5 cm), une tache importante de glucose (25,8 cm). Les chiffres entre parenthèses indiquent la distance en centimètres entre la ligne de départ et le centre de la tache.

Les acides gras analysés par chromatographie en phase gazeuse (comme ceux du lot précédent) sont composés d'un mélange d'acides palmitique, stéarique, palmitoléique, oléique et tuberculostéarique.

## Chromatographie sur papier du phosphatide

Nous avons soumis le phosphatide intact à une chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman N° 4 (technique descendante) d'après Benson et Maruo (120).

Comme solvant nous avons utilisé d'abord le phénol saturé d'eau (durée de développement 16 heures). Ensuite les deux systèmes suivants :

a) 1,246 cm<sup>3</sup> de butanol + 84 cm<sup>3</sup> d'eau.

b) 620 cm<sup>3</sup> d'acide propionique + 790 cm<sup>3</sup> d'eau.

sont mélangés dans les proportions nécessaires pour obtenir une seule phase et une nouvelle chromatographie est effectuée sur la même feuille dans la direction perpendiculaire à la précédente (16 heures). La révélation par le réactif molybdique et l'exposition à la lumière U.V. permet de détecter plusieurs taches non identifiées. liées.

La fraction hydrosoluble obtenue par saponification alcaline ménagée a été chromatographiée sur papier Whatman N° 4 dans le méthanol-acide formique-eau (80:15:5), ascendante pendant 4 heures. La révélation par le réactif molybdique fait apparaître une tache allongée à partir de la ligne de départ et trois taches aux  $R_f = 0,10$ ;  $0,27$  et  $0,43$ . La révélation par l'acide periodique-benzidine donne plusieurs taches allongées qui se confondent en une trainée à partir de la ligne de départ.

## Composition de l'hydrosoluble

### Déphosphorylation

Nous avons déphosphorylé 2,2 g d'hydrosoluble par chauffage avec l'ammoniaque dans les conditions décrites plus haut. La chromatographie sur papier Whatman N° 1 (descendante, 30 heures) du produit déphosphorylé dans l'isopropanol-acide acétique-eau et la révélation par l'acide periodique-benzidine permettent de déceler cinq taches : 1) sur la ligne de départ; 2)  $R_f = 0,19$ , correspondant à l'inositol; 3)  $R_f = 0,80$ , au niveau du glycérol; 4)  $R_f = 0,05$ , semblant correspondre à l'inosito-dimannoside; 5)  $R_f = 0,14$ , non identifiée.

### Acétylation et chromatographie des acétates

L'acétylation de 2 g de produit déphosphorylé par l'anhydride acétique dans la pyridine donne 3,6 g de sirop jaune pâle.

3,4 g de ce sirop sont chromatographiés sur 90 g de trisilicate de magnésium et célite (2:1). Elutions de 300 cm<sup>3</sup>.

Les fractions 3 et 4 sont constituées par l'acétate de glycérol pur que nous avons distillé dans un tube à boules à 60°/0,02 mm.

|                |                                               |             |         |        |
|----------------|-----------------------------------------------|-------------|---------|--------|
| <u>Analyse</u> | C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> | calculé % : | C 49,54 | H 6,42 |
|                |                                               | trouvé % :  | C 49,66 | H 6,31 |
|                |                                               |             | C 49,56 | H 6,51 |

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| 1. Benzène . . . . .            | 0      |
| 2. Benzène . . . . .            | 0      |
| 3. Benzène-éther (95:5) . . .   | 356 mg |
| 4. Benzène-éther (95:5) . . .   | 225 mg |
| 5. Benzène-éther (15:5) . . .   | 263 mg |
| 6. Benzène-éther (15:5) . . .   | 248 mg |
| 7. Benzène-éther (15:5) . . .   | 54 mg  |
| 8. Benzène-éther (15:5) . . .   | 22 mg  |
| 9. Benzène-éther ( 3:2) . . .   | traces |
| 10. Benzène-éther ( 3:2) . . .  | 0      |
| 11. Benzène-éther ( 1:1) . . .  | 60 mg  |
| 12. Benzène-éther ( 1:1) . . .  | 95 mg  |
| 13. Benzène-éther ( 1:2) . . .  | 55 mg  |
| 14. Ether. . . . .              | 91 mg  |
| 15. Ether. . . . .              | 80 mg  |
| 16. Ether. . . . .              | 75 mg  |
| 17. Ether-éthanol (98:2). . . . | 97 mg  |
| 18. Ether-éthanol (19:1). . . . | 161 mg |
| 19. Ether-éthanol (19:1). . . . | 374 mg |
| 20. Ether-éthanol (19:1). . . . | 352 mg |
| 21. Ether-éthanol (19:1). . . . | 221 mg |
| 22. Ether-éthanol (19:1). . . . | 98 mg  |
| 23. Ether-éthanol (19:1). . . . | 82 mg  |
| 24. Ether-éthanol (19:1). . . . | traces |

3 013 mg = 88 %

La fraction 5 contient un mélange d'acétate de glycérol avec l'acétate d'inositol que nous avons pu séparer ensuite, par chromatographie; nous avons obtenu 67 mg d'acétate de glycérol et 196 mg d'acétate d'inositol.

Les fractions 6-8 contiennent l'hexaacétate d'inositol pur, F. 217-218°, en mélange avec l'hexaacétate d'inositol authentique, F. 216-218°.

Analyse  $C_{18}H_{24}O_{12}$  calculé % : C 50,00 H 5,60  
trouvé % : C 50,05 H 5,65

Les fractions 11-13, F. 79-80,  $(\alpha)_D^{21} = + 125^\circ$  (c = 0,15; chloroforme), contiennent 47,7 % de glucose.

#### Désacétylation de l'acétate F. 79-80°

150 mg de cette substance dissous dans 5 cm<sup>3</sup> de méthanol absolu sont additionnés de 0,10 cm<sup>3</sup> de méthylate de sodium 0,1 N. La solution reste 30 minutes à la glacière et ensuite une nuit à la température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous vide et nous obtenons 80 mg de produit désacétylé, soluble dans l'eau, contenant 86,5 % de glucose. La teneur en glucose théorique pour un inosito-pentaglucoside est 90,9 %, pour son acétate, 48,5 %. Le produit désacétylé est hydrolysé par chauffage à reflux pendant 3 heures avec l'acide chlorhydrique 2 N, désionisé par Amberlite IR 4B et chromatographié dans l'isopro -

panol-acide acétique-eau. La révélation par l'acide periodique-benzidine permet de déceler la présence d'inositol et de glucose.

Nous avons également préparé la phénylosazone du glucose en ajoutant du chlorhydrate de phénylhydrazine et de l'acétate de soude en solution aqueuse à l'hydrolysat préalablement désionisé. On chauffe ce mélange 8 minutes au bain-marie bouillant; les cristaux obtenus fondent à 209-211°; le point de fusion n'est pas déprimé par mélange avec la phénylosazone de glucose authentique (litt. : 208°).

#### Analyse élémentaire de l'acétate d'inosito-pentaglucoside

$C_{78}H_{104}O_{52}$  calculé % : C 50,00 H 5,55  
trouvé % : C 49,75 H 5,69

La fraction 14, F. 178-180°,  $(\alpha)_D^{21} = +20,5^\circ$  (C = 1,2; chloroforme), contient 23,5 % de mannose. Ce produit a été également désacétylé par le méthylate de sodium; il contient alors 50,5 % de mannose. Hydrolysé ensuite (comme ci-dessus) et chromatographié sur papier dans les mêmes conditions que la substance décrite précédemment, il donne une tache au niveau de l'inositol et une autre au niveau du mannose. Théorie pour inosito-mono-mannoside : 52,6 % de mannose, pour son acétate, 25 %.

#### Analyse élémentaire de l'acétate d'inosito-monomannoside.

$C_{30}H_{40}O_{20}$  calculé % : C 50,00 H 5,55  
trouvé % : C 49,69 H 5,48

Les fractions 18-21, F. 135-136°,  $(\alpha)_D^{21} = +54^\circ$  (c = 1,4; chloroforme), contiennent 37 % de mannose, le produit désacétylé,  $(\alpha)_D^{19} = +77^\circ$ , contient 68 % de mannose. La teneur théorique en mannose pour un inosito-dimannoside est 71,2 % et pour son acétate, 35,6 %. La chromatographie sur papier (comme dans le cas précédent) de la substance désacétylée et hydrolysée met en évidence une tache de  $R_f = 0,18$  (inositol) et la seconde de  $R_f = 0,46$  (mannose).

#### Analyse élémentaire de l'acétate d'inosito-dimannoside.

$C_{42}H_{56}O_{28}$  calculé : C 50,00 H 5,55  
trouvé : C 49,84 H 5,53

#### Structure de l'inosito-di-D-mannoside; nature de la liaison mannose-mannose.

##### Oxydation periodique.

a) 40 mg de produit provenant de la désacétylation de l'acétate F. 135-136° dissous dans 1 cm<sup>3</sup> d'eau sont additionnés de 10 cm<sup>3</sup> d'acide periodique 0,1 M et laissés en contact à l'obscurité à la température ambiante. Au bout de 20 heures la solution est neutralisée par la baryte, le précipité essoré, et le filtrat désionisé par l'Amberlite MB 3. La solution est concentrée sous vide et le résidu repris par 5 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique aqueux à 5 % et chauffé pendant 5 heures. La solution aqueuse est neutralisée par l'Amberlite IR 4B et chromatographiée sur papier Whatman N° 1 dans l'isopropanol-acide acétique-eau pendant 24 heures. La révélation par le réactif de Partridge ne permet de déceler aucune tache.

b) 10 mg de l'inosito-dimannoside dissous dans 0,5 cm<sup>3</sup> d'eau sont additionnés de 5 cm<sup>3</sup> d'acide periodique 0,1 M et le tout dilué à 10 cm<sup>3</sup>. La solution reste 18 heures à l'obscurité à la température ambiante. On ajoute ensuite 8 cm<sup>3</sup> de solution saturée de bicarbonate de sodium, 12 cm<sup>3</sup> d'acide arsénieux N/10 et 2 cm<sup>3</sup> de solution d'iodure de potassium à 20 %. Au bout de 20 minutes on dose l'excès d'acide arsénieux par l'iode 0,105 N. Nous opérons parallèlement avec le mannose et un témoin "à blanc" (les réactifs seuls). Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 9.

TABLEAU 9

| Substance           | Poids en mg | Moles x 10 <sup>-4</sup> | cm <sup>3</sup> d'I <sub>2</sub> consommé | Différence de cm <sup>3</sup> avec le témoin | Atomes d'oxygène consommés x 10 <sup>-4</sup> | Atomes d'oxygène consommés/mole de substance |
|---------------------|-------------|--------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Témoin              |             |                          | 3                                         |                                              |                                               |                                              |
| Mannose             | 18          | 1                        | 12,50                                     | 9,50                                         | 4,98                                          | 4,98                                         |
| Inosito-dimannoside | 9,1         | 0,18                     | 5,77                                      | 2,77                                         | 1,45                                          | 8,06                                         |

Oxydation periodique selon Hough; dosage de l'aldéhyde formique.

16,2 mg d'inosito-dimannoside sont additionnés de 10 cm<sup>3</sup> de méthaperiodate de sodium 0,05 M en présence de tampon phosphate à pH 8. On abandonne la solution à l'obscurité, à la température ambiante. Après 24 heures de contact on ajoute 10 cm<sup>3</sup> de bisulfite de sodium à 36° Bé et on complète la solution à 25 cm<sup>3</sup>. Ensuite on prélève une partie aliquote et on dose le formol libéré au moyen du réactif chromotropique. On opère parallèlement sur le sorbitol, utilisé comme substance de référence, sur le galactinol et sur l'inositol.

TABLEAU 10

| Substance              | Poids en mg | Moles x 10 <sup>-4</sup> | $\log \frac{I_0}{I}$ à 570 mμ | Moles de HCHO/mole de substance |
|------------------------|-------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Sorbitol               | 10,4        | 0,57                     | 1,9                           | 2                               |
| Inositol               | 13          | 0,72                     | 0,014                         | 0,012                           |
| Galactinol (dihydrate) | 13,2        | 0,35                     | 0,55                          | 0,94                            |
| Inosito-dimannoside    | 16,2        | 0,32                     | 0,010                         | 0,019                           |

### Méthylation de l'inosito-dimannoside selon Laidlaw et Wylam (161).

150 mg d'inosito-dimannoside (obtenu par désacétylation de son acétate) sont dissous dans 2 cm<sup>3</sup> d'eau et additionnés de 3 cm<sup>3</sup> de soude aqueuse à 30 %. Puis on ajoute goutte à goutte, en agitant énergiquement, 8 cm<sup>3</sup> de sulfate de méthyle et 15 cm<sup>3</sup> de soude à 30 %; l'addition dure une heure environ. On continue l'agitation pendant deux heures. Ensuite on ajoute 3 g de soude en pastilles et 6 cm<sup>3</sup> de sulfate de méthyle. On laisse toute la nuit au repos à la température ambiante. Au bout de 20 heures on ajoute 20 cm<sup>3</sup> d'eau et épuise la solution au chloroforme. L'extrait chloroformique, après évaporation à sec, fournit 110 mg de produit incolore. La phase aqueuse est additionnée de nouveau de 3 g de soude en pastilles et de 7 cm<sup>3</sup> de sulfate de méthyle. On répète ce traitement deux fois et extrait la solution comme ci-dessus. On isole 25 mg de produit qui sont réunis avec la fraction obtenue précédemment. L'indice de méthoxyle de cette substance est 23,57 % (la théorie pour un inosito-dimannoside perméthylé est 26,7 % de méthoxyle). 120 mg de ce produit sont dissous dans 2 cm<sup>3</sup> d'iodure de méthyle et additionnés de 400 mg d'oxyde d'argent. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 16 heures avec agitation magnétique. On répète cette opération trois fois, puis on essore le précipité d'iodure d'argent et on le lave abondamment avec du chloroforme chaud. Après avoir évaporé à sec le filtrat, on obtient 100 mg de sirop jaune, très visqueux, contenant 25,23 % de méthoxyle. Un traitement supplémentaire par l'iodure de méthyle et l'oxyde d'argent ne change pas l'indice de méthoxyle.

### Hydrolyse de l'inosito-dimannoside méthylé.

100 mg de produit sont chauffés à reflux avec 5 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique N pendant 11 heures. Ensuite la solution est neutralisée par le carbonate d'argent fraîchement préparé. On essore le précipité et le filtrat est extrait au chloroforme; la solution aqueuse est évaporée à sec et le résidu épuisé par l'acétone chaude.

Les solutions chloroformique et acétonique sont chromatographiées sur papier Whatman N° 1 dans le butanol-éthanol-ammoniaque-eau (40:10:1:49) (technique ascendante, 22 heures); révélation par le phtalate acide d'aniline; l'extrait chloroformique contient le tétraméthyl-mannose tandis que l'extrait acétonique contient les triméthyl- et tétraméthylmannoses.

Un autre chromatogramme, effectué dans les mêmes conditions, est révélé par : a) l'acide periodique-benzidine; aucune tache ne se révèle par ce réactif. b) le trichloracétate de N,N' diméthylaniline pulvérisé sur la feuille qui est ensuite séchée pendant 5 minutes à 105°. Les triméthyl- et tétraméthylmannoses de l'inosito-dimannoside ne sont pas révélés. On asperge le même chromatogramme avec le phtalate acide d'aniline : les taches brunes de triméthyl- et tétraméthylmannose apparaissent.

### Oxydation periodique du triméthylmannose.

Le mélange de triméthyl- et tétraméthylmannose est chromatographié sur papier Whatman N° 3 dans les conditions indiquées plus haut. Après

avoir localisé les deux sucres sur la feuille, nous éluons le triméthylmannose avec de l'acétone.

12 mg de sucre méthylé sont additionnés de 10 cm<sup>3</sup> de métaperiodate de sodium 0,1 M (\*), pH 7,55 (mesuré au pH-mètre de Beckman) et la solution diluée à 25 cm<sup>3</sup> dans une fiole jaugée. On laisse 5 heures 15 minutes à l'obscurité à la température ambiante. Ensuite on ajoute 8 cm<sup>3</sup> de solution saturée de bicarbonate de sodium, 12 cm<sup>3</sup> d'acide arsénieux 0,1 N et 2 cm<sup>3</sup> d'iodure de potassium à 20 %. Après 20 minutes on dose l'excès d'acide arsénieux par l'iode 0,105 N.

Le 2, 3, 6-triméthylmannose provenant du galactomannane est soumis au même traitement. On opère parallèlement avec un témoin contenant les réactifs seuls.

Le triméthylmannose isolé de l'inosito-dimannoside consomme 0,81 molécule de periodate, le 2, 3, 6-triméthylmannose, 0,075 molécules.

Les données de l'expérience figurent dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU 11

| Substance                  | Poids<br>en mg | Moles<br>x 10 <sup>-4</sup> | cm <sup>3</sup> d'I <sub>2</sub><br>consommé | Différence<br>de cm <sup>3</sup> avec<br>le témoin | Atomes<br>d'oxygène<br>consommés<br>x 10 <sup>-4</sup> | Atomes<br>d'oxygène<br>consommés/mole<br>de substance |
|----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Témoin                     |                |                             | 6,03                                         |                                                    |                                                        |                                                       |
| 2, 3, 6-0-triméthylmannose | 15,4           | 0,69                        | 6,04                                         | 0,01                                               | 0,052                                                  | 0,075"                                                |
| Triméthylmannose           | 12             | 0,54                        | 6,86                                         | 0,83                                               | 0,435                                                  | 0,81                                                  |

Préparation de l'anilide du 2, 3, 4, 6-0-tétraméthyl-D-mannose.

9 mg de tétraméthylmannose sont chauffés à reflux pendant 6 heures avec 0,2 cm<sup>3</sup> d'alcool absolu et 6 mg d'aniline fraîchement distillée. On ajoute ensuite une goutte d'acide chlorhydrique concentré et continue le chauffage pendant 30 minutes. On laisse au repos toute la nuit. Puis on évapore à sec et le résidu est extrait à l'éther. La solution étherée est concentrée à 0,5 cm<sup>3</sup> et on ajoute quelques gouttes d'éther de pétrole. La cristallisation s'amorce; l'anilide obtenu fond à 142-143°, son mélange avec l'échantillon authentique ne présente pas d'abaissement du point de fusion (litt. : 144-145°).

(\*) Pour préparer la solution on dissout le m-periodate à chaud et on ajoute de la soude 0,1 N jusqu'au pH désiré.

### Identification du phosphate d'inositol.

La fraction hydrosoluble provenant de la saponification alcaline ménagée du phosphatidyl-inosito-dimannoside est chauffée à reflux avec l'acide chlorhydrique N pendant 15 minutes afin d'enlever les sucres. L'hydrolysate est ensuite neutralisé par la cyclohexylamine à pH 6,5 et évaporé à sec. Le résidu est trituré plusieurs fois avec l'éthanol bouillant. La partie insoluble dans l'alcool est dissoute dans l'eau; on filtre la solution aqueuse et le filtrat est additionné d'acétone. La solution se trouble mais la cristallisation ne s'amorce pas. Après évaporation à sec, le résidu est chromatographié sur papier Whatman N° 1 pendant 66 heures à 30°, avec écoulement du solvant en bas de la feuille. Le solvant de développement utilisé est l'isopropanol-ammoniac-eau (7:1:2); la révélation se fait par le réactif molybdique.

Nous observons l'apparition de deux taches : l'une faible à 13 cm de la ligne de départ, au niveau du 2-monophosphate du méso-inositol témoin, et la seconde plus forte, à 9,5 cm, correspondant au 1-monophosphate.

Le même produit, chromatographié dans le laboratoire du Professeur Ballou, dans le même système de solvants à 40° pendant 48 heures, donne également deux taches :

- 1) à 19 cm de la ligne de départ, plus importante, au niveau du 1-monophosphate du méso-inositol témoin;
- 2) à 23 cm de la ligne de départ, faible, au niveau du 2-monophosphate du méso-inositol témoin.

### Hydrolyse acide du phosphatide intact.

100 mg de phosphatidyl-inosito-dimannoside sont hydrolysés par chauffage à reflux pendant 30 minutes avec l'acide chlorhydrique N.

Après extraction des acides on traite l'hydrolysate comme ci-dessus. La chromatographie sur papier dans les mêmes conditions que plus haut et la révélation par le réactif molybdique montrent également deux taches correspondant aux 1-monophosphate et 2-monophosphate du méso-inositol.



## RESUME ET CONCLUSIONS

Au cours de notre travail nous avons isolé et étudié les fractions phosphatidiques de :

- a) Mycobacterium phlei, classé dans la catégorie des bactéries paratuberculeuses ;

et de deux souches de Mycobacterium tuberculosis :

- b) H-37 Rv streptomycino-résistante, souche humaine virulente ;
- c) Bacille Calmette-Guerin, souche bovine atténuée.

### a) Mycobacterium phlei.

Les phosphatides de cette souche sont composés d'un mélange complexe d'au moins quatre fractions séparées par chromatographie sur colonne, contenant les mêmes constituants dans différentes proportions.

Après une saponification alcaline nous isolons un seul acide gras : l'acide palmitique, et une fraction hydrosoluble contenant le glycérol, l'acide phosphorique, l'inositol et le mannose.

Parmi les produits d'hydrolyse acide de ce phosphatide, nous identifions six acides aminés : acides aspartique et glutamique, alanine, glycocolle, proline et ornithine.

### b) Souche H-37 Rv streptomycino-résistante.

Ce phosphatide isolé d'un mutant streptomycino-résistant de la souche H-37 Rv, entièrement dépourvu d'azote, peut être séparé en deux fractions principales qui se distinguent par leur solubilité dans le chloroforme contenant du méthanol :

L'une, F. 164°, est le sel de magnésium (de calcium ou de sodium) d'un acide phosphatidique ;

L'autre, F. 206-208°, est le sel de magnésium (de calcium ou de sodium) d'un phosphatidyl-inosito-di-D-mannoside.

Les acides gras de ces deux fractions sont saturés et sont constitués par un mélange d'acides palmitique et stéarique.

### c) Bacille Calmette-Guerin

Les phosphatides du BCG que nous avons étudiés proviennent de souches cultivées sur deux milieux différents :

- 1) Milieu de Sauton ;
- 2) Milieu de culture peptoné et glycériné.

En appliquant une nouvelle technique d'extraction à la souche cultivée sur milieu de Sauton, nous obtenons d'emblée une fraction phosphatidique à peu près pure et dont la composition est pratiquement identique à celle du phosphatidyl-inosito-di-D-mannoside de la souche H-37 Rv streptomycino-résistante.

Les phosphatides isolés à partir de bacilles cultivés sur milieu peptoné et glycérolé s'avèrent un mélange plus complexe. Ils donnent après saponification, déphosphorylation et acétylation, les acétates d'inositol, d'un inosito-monomannoside, d'un inosito-dimannoside et d'un inosito-pentaglucoside que nous avons pu identifier après leur séparation chromatographique.

En plus des acides palmitique et stéarique, ils contiennent les acides palmitoléique, octadécénoïque et tuberculostéarique.

#### Structure chimique de l'inosito-di- $\alpha$ -D-mannoside.

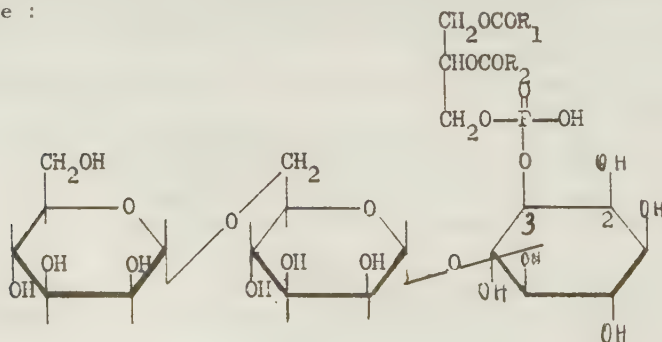
Nous avons pu établir la structure du phosphatidyl-inosito-di- $\alpha$ -D-mannoside isolé à partir de toutes les souches de M. tuberculosis étudiées.

Les méthylations du phosphatide intact et du "trisaccharide" fournissent un mélange de tri- et de tétraméthylmannose ce qui nous permet de conclure à la présence d'un dimannoside lié à l'inositol. D'autre part la révélation spécifique du chromatogramme des produits de méthylation qui permet d'identifier le 2, 3, 4-triméthylmannose, ainsi que les résultats des oxydations périodiques de l'inosito-dimannoside montrent que le mannobiose comporte la liaison glycosidique 1 $\rightarrow$ 6. L'activité optique de l'inosito-dimannoside et de son dodécaacétate permettent d'attribuer la configuration  $\alpha$  à cette liaison.

Dans le phosphate d'inositol obtenu par les hydrolyses alcaline et acide ménagées du phosphatide, l'acide phosphorique est lié surtout au carbone 1 ou 3 de l'inositol.

A la lumière des travaux récents (139,140,141) qui établissent cette structure également pour le phosphate d'inositol dans les phosphatides intacts, il est probable que cette liaison est effectivement présente dans le phosphatidyl-inosito-di- $\alpha$ -D-mannoside de M. tuberculosis.

Pour conclure, nous proposons pour ce phosphatide la structure suivante :



où R1 et R2 correspondent aux restes d'acides : palmitique, stéarique, palmitoléique, octadécénoïque ou tuberculostéarique, selon les souches étudiées.

### Autres constituants phosphatidiques.

Quant à l'acide phosphatidique isolé à partir de H-37 Rv s.r., il se pourrait qu'il soit formé à partir de phosphatides plus complexes par hydrolyse enzymatique ou spontanée au cours de l'extraction. En effet, la nouvelle méthode d'extraction utilisée dans le cas du BCG fournit des phosphatides ne contenant que des traces d'acide phosphatidique.

La composition des fractions phosphatidiques étudiées varie suivant la souche et le milieu de culture.

Ainsi dans la souche de BCG cultivée sur milieu peptoné et glycérimé, en plus du phosphatidyl-inosito-di- $\alpha$ -D-mannoside, nous avons réussi à mettre en évidence la présence d'un phosphatidyl-inositol, d'un phosphatidyl-inosito-monomannoside et d'un phosphatidyl-inosito-penta-glucoside.

Toutes les préparations phosphatidiques provenant de H-37 Rv s.r. et du BCG sont dépourvues d'azote.

Ni l'acide mannose-glycérol-diphosphorique signalé par Anderson, Lothrop et Creighton (74), ni l'acide inosito-glycéro-diphosphorique de De Suto-Nagy et Anderson (23), n'ont été décélés.

Quant à l'activité immunisante des phosphatides, ajoutons que toute la série d'échantillons préparés par nous a été testée par le Professeur H. Bloch à Pittsburg, mais les résultats ne sont pas concluants. Le phosphatidyl-inosito-di- $\alpha$ -D-mannoside pur ne semble pas être actif.



## BIBLIOGRAPHIE

1. A. HAMMERSCHLAG. Bakteriologisch-chemische Untersuchungen der Tuberkelbazillen. - Wien.Akad.Ber. 1888, 97, 988; Monatshefte d. Chemie 1889, 10, 9.
2. R.J. ANDERSON. The chemistry of the lipoids of the tubercle bacillus and certain other microörganisms. Fort. Chem. organ. Naturstoffe, 1939, 3, 145.
3. R.J. ANDERSON. The Chemistry of the lipids of the tubercle bacilli. Harvey Lectures, 1939-1940, 271.
4. R.J. ANDERSON. Structural peculiarities of acid-fast bacterial lipids. - Chem. Rev., 1941, 29, 225.
5. R.J. ANDERSON. The Chemistry of the lipids of the tubercle bacillus. - Yale J. Biol. Med., 1943, 15, 311.
6. E. LEDERER. Chemistry and Biochemistry of Mycobacteria. - Colloquium on the Chemotherapy of Tuberculosis, Trinity College, Dublin 1952.
7. E. LEDERER. Chimie et Biochimie des lipides des Mycobactéries. Symposium sur le Métabolisme Microbien au II<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie, 1952, p. 5-31.
8. J. ASSELINEAU. Lipides du Bacille tuberculeux; constitution chimique et activité biologique. - Progrès de l'exploration de la Tuberculose, 1952, 5, 1-55.
9. J. ASSELINEAU et E. LEDERER. Chimie des lipides bactériens. Progrès Chim. Subst. organ. Natur., 1953, 10, 170.
10. J. ASSELINEAU et E. LEDERER. Chemical structure and biological activity of Mycolic acids. - Ciba Foundation Symposium of experimental tuberculosis, 1955, 14-38.
11. E. LEDERER. Le "Cord Factor", lipide toxique de Mycobacterium tuberculosis; constitution chimique et synthèse. - Festschrift Arthur Stoll, 1957, 384-394.
12. H. DEMARTEAU-GINSBURG. Chimie des lipides de bacilles tuberculeux de souches bovines. - Thèse, 1958.
13. K. LANDSTEINER und H. LAMPL. Quantitative Untersuchungen über die Einwirkung von Komplement auf Präcipitate. - Ztschr.f. Immunitätsforsch., 1917, 26, 193.
14. K. MEYER. Ueber die Komplementbindenden Bestandteile des Tuberkelbazillus. Ueber antigene Eigenschaften von Lipoiden. - Ztschr.f.Immunitätsforsch., 1912, 14, 359.

15. M.A. MACHEBOEUF, G. LEVY et M. CHAMBAZ. Etudes sur les antigènes fixateurs des bacilles tuberculeux. Antigènes fixateurs contenus dans les substances lipoidiques extraites de bacilles tués par la chaleur. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1935, 17, 1194.
16. M. FAURE. Les haptènes lipoidiques de fixation de l'alexine. Thèse 1940, p. 222.
17. L. NEGRE et A. BOQUET. Sur les propriétés de l'antigène méthyl-lique. Ann. Inst. Pasteur, 1930, 45, 415.
18. L. NEGRE. Prévention et traitement spécifiques de la tuberculose par le BCG et par l'antigène méthyl-lique. - Masson et Cie., édit., Paris 1956.
19. R.J. DUBOS, D.W. WEISS and R. W. SCHAEDELER. Enhancing effect of adjuvants on the antituberculous immunity elicited in mice by methanol extracts of tubercle bacilli. - Am. Rev. Tuberc., 1956, 73, 780.
20. C.A. WILLIAMS and R.J. DUBOS. Studies on fractions of methanol extracts of tubercle bacilli. I. Fractions which increase resistance to infection. J. Exp. Med., 1960, 981.
21. R.J. ANDERSON, R.L. PECK and M.M. CREIGHTON. The polysaccharide of the phosphatide obtained from cell residues in the preparation of tuberculin. - J. Biol. Chem., 1940, 136, 211.
22. R.L. PECK and R.J. ANDERSON. The fatty acids in the phosphatide prepared from cell residues from tuberculin. - J. Biol. Chem., 1941, 138, 135.
23. G.J. DE SUTO-NAGY and R.J. ANDERSON. Concerning inositol-glycerol-diphosphoric acid, a component of the phosphatide of human tubercle bacillus. - J. Biol. Chem., 1947, 171, 761.
24. A. MOELLER. Mikroorganismen die den Tuberkelbazillen verwandt sind und bei Tieren eine miliäre Tuberkelkrankheit verursachen. Deutsch. Med. Woch., 1898, 24, 376.
25. E. BAER and M. KATES. Migration during hydrolysis of esters of glycerophosphoric acid; the acid and alkaline hydrolysis of L- $\alpha$ -Lecithins. - J. Biol. Chem., 1950, 185, 615.
26. E. BAER and F. MARTIN. Synthesis of D- $\alpha$ -lecithin, an active antigen component in the serodiagnosis of syphilis. - J. Biol. Chem., 1951, 193, 835.
27. E. BAER and J. MAURUKAS. An improved procedure for the synthesis of enantiomeric  $\alpha$ -lecithins. - J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 158.
28. E. BAER, D. BUCHNEA and A.G. NEWCOMBE. Synthesis of unsaturated  $\alpha$ -lecithins; L- $\alpha$ -(dioleoyl) lecithins. - J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 232.
29. D.J. HANAHAN. Positional asymmetry of fatty acids on lecithin. J. Biol. Chem., 1954, 211, 313.
30. J. FOLCH. The chemical structure of phosphatidyl serine. - J. Biol. Chem., 1948, 174, 439.
31. J. FOLCH. Brain cephalin, a mixture of phosphatides. Separation from it of phosphatidyl serine, phosphatidyl ethanolamine and a fraction containing an inositol phosphatide. - J. Biol. Chem., 1942, 146, 35.

32. E. BAER and H.L. STANCER. The synthesis of O-(L- $\alpha$ -glyceryl-phosphoryl) ethanolamine and some comments on the stereochemical aspects of the biosynthesis of glycerolphosphatides from carbohydrates. - J. Am. Chem. Soc. 1953, 75, 4510.
33. E. BAER and J. MAURUKAS. Phosphatidyl serine. - J. Biol. Chem., 1955, 212, 25.
34. R.J. ANDERSON. Occurrence of inosite in the phosphatide fraction of human tubercle bacillus. - J. Am. Chem., Soc., 1930, 52, 1607
35. E. KLENK and R.Z. SAKAI. Inositmonophosphorsäure, ein Spaltprodukt der Sojabohnenphosphatide. - Z. physiol. Chemie, 1939, 258, 33.
36. J. FOLCH and D. WOLLEY. Inositol a constituent of brain phosphatide. - J. Biol. Chem., 1942, 142, 963.
37. J. FOLCH. Brain diphosphoinositide, a new phosphatide having inositol metadiphosphate as a constituent. - J. Biol. Chem., 1949, 177, 505.
38. T. MALKIN and A.G. POOLE. The structure of the glycerinositophosphatide of Ground-nut. - J. Chem. Soc., 1953, 698, 3470.
39. M. FAURE et M.J. MORELEC-COULON. Isolement d'un acide glycéro-inosito-phosphatidique contenu dans le germe de blé. - C.R. Ac. Sc., 1953, 236, 1104.
40. M. FAURE et M.J. MORELEC-COULON. Isolement d'un phosphatide cristallisé à partir du muscle cardiaque de Bœuf : l'acide glycéro-inosito-phosphatidique. - C.R. Ac. Sc. 1954, 238, 411.
41. J.N. HAWTHORNE and H.G. HUBSCHER. An inositol containing phosphate in liver tissue. - Biochem. J. 1956, 64, 53.
42. J.M. Mc KIBBIN. A monophosphoinositide of liver. - J. Biol. Chem., 1956, 220, 537.
43. D.N. RHODES and C.H. LEA. Composition of egg phospholipids. - Nature, 1956, 177, 1129.
44. E. OKUHARA and T. NAKAYAMA. Conjugated lipoids. Structure of inositol lipoids. - J. Biol. Chem., 1955, 215, 295.
45. M.J. MORELEC-COULON et M. FAURE. Acide glycéro-inosito-phosphatidique. Structure des glycéro-inositophosphatides de l'arachide. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 1315.
46. F. FEULGEN, K. IMHAUSER und M. BEHRENS. Zur Kenntnis des Eigenschaften des Plasmalogens, Darstellung und Natur des Plasmals. - Z. Physiol. Chem., 1929, 180, 161.
47. R. FEULGEN und M. BEHRENS. Zur Kenntnis des Plasmalogens. Eine weitere Methode zur Identifizierung des Plasmals. - Z. Physiol. Chem., 1938, 256, 15.
48. R. FEULGEN und T. BERSIN. Zur Kenntnis des Plasmalogens. Eine neuartige Gruppe von Phosphatiden : Acetalphosphatide. Z. Physiol. Chem., 1939, 260, 217.
49. E. KLENK und H. DEBUCH. Zur Kenntnis des cholinhaltigen Plasmalogene (Acetalphosphatide) des Rinderherzmuskels. - Z. Physiol. Chem., 1955, 299, 66.
50. M. PANGBORN. The composition of cardiolipin. - J. Biol. Chem., 1947, 168, 351.

51. M. FAURE et M.J. MORELEC-COULON. Constitution du cardio-lipide. Presence d'acide glycérodiphosphorique dans les produits de l'hydrolyse chlorhydrique. - C. R. Ac. Sc., 1956, 246, 2181.
52. M.G. McFARLANE. Structure of cardiolipin. - Nature, 1958, 182, 946.
53. M.G. McFARLANE and L.W. WHEELDON. Position of the fatty acids in the cardiolipin. - Nature, 1959, 183, 1803.
54. A.A. BENSON and B. MARUO. Plant phospholipids. Identification of the phosphatidyl glycerols. - Bioch. Bioph. Acta, 1958, 27, 189.
55. D.N. RHODES and C.H. LEA. Phospholipids. On the composition of Hen's egg phospholipids. - Biochem. J., 1957, 65, 526.
56. H. IGARASHI, K. ZAMA and M. KATADA. Presence of threonine containing phospholipid in tunny muscle. - Nature, 1958, 181, 1282.
57. H.E. CARTER, D.B. SMITH and D.N. JONES. A new ethanolamine-containing lipid from egg yolk. - J. Biol. Chem., 1958, 232, 681.
58. F.D. COLLINS. Studies on phospholipids. A complex phospholipid from sheep brain. - Biochem. J., 1959, 72, 532.
59. J.L.W. THUDICHUM. Die chemische Konstitution des Gehirns der Menschen und der Tiere. - Tübingen, 1901, 187.
60. H.E. CARTER, F. GLICK, W.P. NORRIS and G.E. PHILLIPS. Structure of sphingosine. - J. Biol. Chem., 1947, 170, 285.
61. G. ROUSER, J.F. BERRY, G. MARINETTI and E. STOTZ. Studies on the structure of sphingomyelin. I. Oxidation of products of partial hydrolysis. II. Performic and periodic acid oxidations studies. - J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 310, 313.
62. G. MARINETTI and E. STOTZ. Studies on the structure of sphingo-myelin. III. Quantitative data on the peroxide and periodate uptake during the oxidation of sphingomyelin. IV. Configuration of the double bond sphingomyelin and related lipids and a study of their infrared spectra. - J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 1345, 1347.
63. H.E. CARTER, W.D. CELMER, Wm.E.M. LANDS, K.L. MUELLER and H.H. TOMIZAWA. Biochemistry of sphingolipids. Occurrence of a long chain base in plant phosphatides. - J. Biol. Chem., 1954, 206, 613.
64. M. IKAWA, J.B. KOEPFLI, S.G. MUDD and C. NIEMANN. An agent from E. coli causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor. IV. Some nitrogenous components of the phospholipide moiety. - J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 3439.
65. K.J. KRESSLING. Fett der Tuberkelbazillen. - Arch. Sc. Biol. St. Petersburg, 1902, 9, 359.
66. G. BAUDRAN. Produit curatif dérivé de la tuberculine, poison tuberculeux cristallisé. - C.R.Ac.Sc., 1906, 143, 305.
67. J. AUCLAIRE et L. PARIS. Constitution chimique du bacille de Koch et sa matière unissante. Ses rapports avec l'acido-résistance. C.R.Ac.Sc., 1907, 144, 278.
68. S. TAMURA. Zur Chemie der Bakterien. - Z. Physiol. Chem., 1913, 87, 85.
69. A. FROUIN et H. AGULHON. Action favorisante des sels de terres rares sur le développement du bacille tuberculeux. - Bull. Soc. Chim. --- Biol., 1919, 1, 176.

70. R.J. ANDERSON and A.G. RENFREW. Occurrence of mannose in the phosphatide from human tubercle bacillus. - J. Am. Chem. Soc., 1930, 52, 1252.
71. R.J. ANDERSON and E.G. ROBERTS. The polysaccharide occurring in the phosphatide fraction from the human tubercle bacillus. - J. Am. Chem. Soc., 1930, 52, 5023.
72. R.J. ANDERSON. Occurrence of inosite in the phosphatide fraction of human tubercle bacillus. - J. Am. Chem. Soc., 1930, 52, 1607.
73. R.J. ANDERSON and E.G. ROBERTS. The occurrence of mannose in the phosphatide fraction from the human avian and bovine tubercle bacillus. - J. Biol. Chem., 1930, 89, 611.
74. R.J. ANDERSON, W.C. LOTHROP and M.M. CREIGHTON. Studies on the phosphatide of the human tubercle bacillus. - J. Biol. Chem., 1938, 125, 299.
75. R.J. ANDERSON and E.G. ROBERTS. Concerning the composition of the phosphatide fraction isolated from the bovine type of tubercle bacillus. - J. Biol. Chem., 1930, 85, 599.
76. R.J. ANDERSON and E.G. ROBERTS. The phosphatide fraction of avian tubercle bacillus. - J. Biol. Chem., 1930, 85, 519.
77. B. SAUTON. Sur la nutrition du bacille tuberculeux. - C.R.Ac.Sc., 1912, 155, 860.
78. E.R. LONG. A non protein medium suitable for the production of tuberculin in large quantity. - Am. Rev. Tuberc., 1926, 13, 393.
79. J. ASSELINEAU et E. LEDERER. Cires du bacille tuberculeux. Acides mycoliques et acide résistance. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1949, 31, 492.
80. E. CHARGAFF. Ueber die Lipoide des Bazillus Calmette-Guérin (BCG). - Z. Physiol. Chem., 1933, 217, 115.
81. C.H. BOISSEVAIN et C.T. RYDER. Some observations on chemical and biological properties of the phosphatide from the tubercle bacillus. - Am. Rev. Tuberc., 1931, 24, 751.
82. K. BLOCH. Ueber eine Phosphatidsäure aus humanen Tuberkelbazillen. - Z. Physiol. Chem., 1936, 244, 1.
83. K. BLOCH. Ueber phosphorhaltige Lipoide aus humanen Tuberkelbazillen. - Biochem. Z. 1936, 285, 372.
84. M. MACHEBOEUF et M. FAURE. Sur l'existence dans les bacilles tuberculeux d'acides phosphatidiques complexes constitués par de l'acide glycérophosphorique lié par estérification, d'une part à des acides gras, d'autre part à des polyalcools non azotés. - C.R.Ac.Sc., 1939, 209, 700.
85. M.C. PANGBORN. Lipo-proteins in Serology and the role of Lipid Haptens. - Discuss. Faraday Soc., 1949, 6, 110.
86. J.D. CHANLEY and N. POLGAR. Dextrorotatory acids of tubercle bacilli lipids. - Nature, 1950, 166, 693.
- 86 bis. N. POLGAR and R. ROBINSON. Constitution of mycolipenic acid. I. Chem. and Ind., 1951, 685.
87. J. CASON and G. SUMRELL. Structural features of an acid of the phthioic type. - J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 4837.

88. J. CASON and G. SUMRELL. Investigation of a fraction of acids of the phthioic type from the tubercle bacillus. - J. Biol. Chem., 1951, 192, 415.
89. M. BARBIER et E. LEDERER. Sur un acide aminé du phosphatide de *Mycobacterium phlei*. - Biochim. Biophys. Acta, 1952, 8, 590.
90. G. MICHEL et E. LEDERER. Etude chromatographique du phosphatide de *Mycobacterium marianum*. - C.R.Ac.Sc., 1955, 240, 2454.
91. J. FRANCIS, H.M. MACTURK, J. MADINAVEITA and G. A. SNOW. Mycobactin, a growth for *Mycobacterium johnei*. - Biochem. J., 1953, 55, 596.
92. C.H. LEA and D.N. RHODES. Phospholipids. Partition chromatography of egg yolk phospholipins on cellulose. - Biochem. J., 1953, 54, 467.
93. E. VILKAS et E. LEDERER. Purification chromatographique de phosphatides de *Mycobactéries*. - C.R.Ac.Sc., 1955, 240, 1156.
94. G. DENIGES. C.R.Ac.Sc., 1909, 148, 172, 282, 422, d'après Techniques de Laboratoire Masson, 1954, I, p. 761.
95. J. SCHERER. Annalen der Chemie, 1852, 81, 375, cité par Les Inositols - Chimie et Biochimie, par P. Fleury et P. Balatre, Masson, 1947, p. 28.
96. F.P. CHINARD. Photometric estimation of proline and ornithine. J. Biol. Chem., 1952, 199, 91.
97. T. GENDRE et E. LEDERER. Sur les substances azotées des phosphatides de quelques *Mycobactéries*. - Biochemistry of Nitrogen, Helsinki, 1955, p. 313.
98. S. ČMELIK. Ueber Bakterienlipoide. Die Lipoide von *Salmonella ballerup*. - Z. Physiol. Chem., 1953, 293, 222.
99. S. ČMELIK. Ueber Bakterienlipoide. Untersuchungen verschiedener Lipoidfraktionen von *Salmonella paratyphi C*. - Z. Physiol. Chem., 1954, 296, 67.
100. S. ČMELIK. Die komplex gebundenen Lipoide von Diphtheriebakterien aus verschiedenen Nährlösungen. - Z. Physiol. Chem., 1955, 300, 167.
101. O. WESTPHAL und O. LÜDERITZ. Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. - Angew. Chem., 1954, 66, 407.
102. D. AMELUNG und P. BÖHM. Papierchromatographische Trennung von Phosphatiden. - Z. Physiol. Chem., 1954, 298, 199.
103. R.L. METZENBERG and H.K. MITCHELL. Detection of periodate-oxidizable compounds on paper chromatograms. - J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 4187.
104. I. HEILBRON and H. M. BUNBURY. Dictionary of Organic Compounds, Vol. II.
105. E. BAER, H.C. STANCER and I.A. KORMAN. Migration during hydrolysis of esters glycerophosphoric acid. Cephalin and glyceryl-phosphorylethanolamine. - J. Biol. Chem., 1953, 200, 251.
106. J. OLLEY. Instability of the phosphatidic acids. Chem. and Ind., 1954, 1069.

107. P.F. CECCALDI, R. WEGMANN et J. BIEZ-CHARRETON. Chromatographie sur papier des lipides. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, 36, 415.
108. G.J. FRAY and N. FOLGAR. Synthesis of  $\alpha, \beta$ -unsaturated glycerides. - J. Chem. Soc. 1955, 1802.
109. R. JOHANSON. Anthrone in the estimation of hexose sugars with special reference to pentose interference. - Anal. Chem., 1954, 26, 1331.
110. P. BÖHM und G. RICHARZ. Zur quantitativen Bestimmung von Inosit in Phosphatiden. - Z. Physiol. Chem., 1954, 298, 110.
111. J.W. HALLIDAY and L. ANDERSON. The synthesis of myo-inositol in the rat. - J. Biol. Chem. 1955, 217, 797.
112. R. KUHN, H. TRISCHMANN und I. LÖW. Zur Permethylierung von Zuckern und Glycosiden. - Angew. Chem., 1955, 67, 32.
113. E. VILKAS et E. LEDERER. Isolement d'un phosphatidyl-inositoldimannoside à partir d'un phosphatide de Mycobactéries. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1956, 38, 111.
114. E. VILKAS. Sur le phosphatide du bacille Calmette-Guérin. - C.R.Ac.Sc., 1957, 245, 588.
115. J. FOLCH, A.M. LEES, J.A. MEATH and F.N. Le BARON. Preparation of lipide extract from brain tissue. - J. Biol. Chem. 1951, 191, 833.
116. B.K. BEERTHUIS, J.C. KEPPLER. Gas-chromatographic analysis of higher fatty acids; up to and including cerotic acid. - Nature, 1957, 179, 731.
117. D.J. HANAHAN. Structure of lecithins, inositol phosphatides and acetal phosphatide. - Fed. Proc., 1957, 16, 826.
118. E.L. HIRST, L. HOUGH, J.K.N. JONES. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. The separation and determination of methylated aldoses. - J. Chem. Soc., 1949, 928.
119. G.O. ASPINALL, R.B. RASHBROOK and G. KESSLER. The mannans of ivory nut (*Phytolophas macrocarpa*). The partial acid hydrolysis of mannans A and B. - J. Chem. Soc., 1958, 215.
120. B. MARUO and A.A. BENSON. Cyclic glycerophosphate formation from the glycerol phosphatides. - J. Biol. Chem., 1959, 234, 254.
121. J.W. PRATT and N.K. RICHTMYER. Crystalline 3-Deoxy- $\alpha$ -D-ribo-hexose. Preparation and properties of 1,6-anhydro-3-deoxy- $\beta$ -D-arabino-hexopyranose, 1,6-anhydro-3-deoxy- $\beta$ -D-ribo-hexopyranose and related compounds. - J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 2597.
122. M.C. FANGBORN. Serologically active lipopolysaccharides of tubercle bacilli. - Fed. Proc., 1958, 17, 1133.
123. E. VILKAS. Sur la structure chimique du phosphatide du bacille Calmette-Guérin. - C.R.Ac.Sc., 1959, 248, 604.
124. L. HOUGH, M.B. PERRY. An aid to structural evaluation in the oligo and poly-saccharide group. - Chem. and Ind. 1956, 768.

125. L. HOUGH, J. K. N. JONES and W.H. WADMAN. Quantitative analysis of mixture of sugars by the method of partition chromatography. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatograms. - J. Chem. Soc., 1950, 1702.
126. O.K. ORLOVA. Structure of the mannan of diphteria bacteria. - Biokhimiya, 1958, 23, 467.
127. G.D. GREVILLE and D.H. NORTHCOTE. Reactions with periodate of 2, 3, 4, 6-tetramethy-D-glucose, the trimethy-D-glucopyranoses, and other methoxy-compounds. - J. Chem. Soc. 1952, 1945.
128. W.N. HAWORTH, E.L. HIRST, F. ISHERWOOD and J.K.N. JONES. 2, 3, 4 Trimethylmannose. - J. Chem. Soc. 1939, 1878.
129. A. DESJOBERT. Préparation d'un inositolmonophosphate par hydrolyse chimique de l'inositolhexaphosphate en milieu faiblement alcalin. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, 36, 1293.
130. M.H. McCORMICK and H.E. CARTER. Inositol monophosphate. - Biochem. Prep. 1952, 2, 65.
131. S. FOSTERNAK et T. FOSTERNAK. Sur la configuration de l'inosite inactive. - Helv. Chim. Acta, 1929, 12, 1165.
132. D.M. BROWN and G.E. HALL. Phospholipids. Myo-inositol-2-phosphate. - J. Chem. Soc., 1959, 357.
133. F.L. PIZER and C.E. BALLOU. Studies on myo-inositol phosphates of natural origin. - J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 915.
134. B. M. ISELIN. Synthesis of inositol-5-monophosphoric acid and scyllitol monophosphoric acid. - J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 3822.
135. D.M. BROWN and A.R. TODD. Nucleotides. Some observations on structure and chemical behaviour of the nucleic acids. - J. Chem. Soc., 1952, 52.
136. C.A. DEKKER and H.G. KHORANA. Carbodiimides. The reaction of dicyclo-hexylcarbodiimide with yeast adenylic acid. A new method for the preparation of monoesters of ribonucleoside 2' and 3' phosphates. - J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 3522.
137. H.G. KHORANA, G.M. TENER, R.S. WRIGHT and J.G. MOFFATT. Cyclic phosphates. Some general observations on the formation and properties of five-, six-, sevenmembered cyclic phosphate esters. - J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 430.
138. T. FOSTERNAK. Recherches dans la série des cyclitols. Transposition d'esters inositol-monophosphoriques. Préparation de l'acide méso-inositol-1(3) phosphorique. - Helv. Chim. Acta, 1959, 42, 390.
139. M. FAURE, M.J. COULON-MORELEC et J. LECOCQ. Dégradation de l'acide glycéroinositophosphatidique par l'acide acétique chaud. C.R.Ac.Sc., 1959, 248, 2252.
140. H. BROCKERHOFF and D. J. HANAHAN. Studies on naturally occurring phosphoinositides. - J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 2591.
141. C.E. BALLOU and L.I. PIZER. Synthesis of an optically active myo-inositol 1-phosphate. - J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 4745.
142. T. MALKIN and J.H. DAVIES. Synthesis and properties of 1-glyceryl-2-myo-inosityl phosphate. - Nature, 1959, 184, 789.

143. R.B. ELLIS and J.N. HAWTHORNE. 1-Glyceryl-2-myo-inositol phosphate : alternative synthesis and behaviour on hydrolysis. - *Nature*, 1959, 184, 790.
144. J.N. HAWTHORNE, P. KEMP and R.B. ELLIS. Configuration of inositol phosphate in liver phosphatidyl inositol. - *Nature*, 1960, 185, 37.
145. O. NERACHER and T. REICHSTEIN. Anreicherung von Vitamin D aus Thunfisch-Leberöl. - *Helv. Chim. Acta*, 1936, 19, 1382.
146. S.M. PARTRIDGE. Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. - *Nature*, 1948, 164, 443.
147. F.R.S. HANES and ISHERWOOD. Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. - *Nature*, 1949, 164, 1107.
148. S. BURROWS, F.S.M. GRYLLS and J.S. HARRISON. Paper chromatography of phosphoric esters. - *Nature*, 1952, 170, 800.
149. R.S. BANDURSKI and B. AXELROD. The chromatographic identification of some biologically important phosphate esters. - *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 405.
150. P.A.J. GORIN and A.S. PERLIN. Configuration of glycosidic linkages in oligosaccharides. Synthesis of  $\alpha$ -D-mannopyranosyl- and  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-disaccharides by the Königs-Knorr reaction. - *Can. J. Chem.*, 1959, 37, 1930.
151. H.T. GORDON, W.T. THORNBURG and L.N. WERUM. Rapid paper chromatography of carbohydrates and related compounds. - *Anal. Chem.*, 1956, 28, 849.
152. P. SAVARY. Contribution à l'étude de la chromatographie sur papier des acides gras. - *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 927.
153. M. MACHEBOEUF et J. DELSAL. Sur le dosage de très petites quantités de phosphore dans les matières organiques. - *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, 25, 116.
154. M. FAURE. Technique de laboratoire. - Masson 1954, 1, p. 762.
155. W. TROLL and R.K. CANNAN. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. - *J. Biol. Chem.*, 1953, 200, 803.
156. Organic Analysis. Interscience Publ. Inc. New-York, 1953, vol. 1, p. 287.
157. P. FLEURY et J. LANGE. Sur l'oxydation des alcools et des sucres par l'acide periodique. - *J. Phar. Chim.*, 1933, 17, 313.
158. E.F. McFARREN. Buffered filter paper chromatography of the amino acids. - *Anal. Chem.*, 1951, 23, 168.
159. YASUDA. Cité par les Techniques de laboratoire. - Masson, 1954, 1, p. 751.
160. R. KUHN und H. SCHRETZMANN. Molekulare Verbindungen von Ammonium-jodiden mit Silberjodid. - *Angew. Chem.*, 1955, 67, 785.
161. R.A. LAIDLAW and C.B. WYLAM. The structure of stachyose. *J. Chem. Soc.*, 1953, 567.



## TABLE DES MATIERES

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION . . . . .                                                                                        | 11 |
| PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE                                                                                        |    |
| LA CHIMIE DES PHOSPHOLIPIDES ANIMAUX ET VEGETAUX                                                              | 13 |
| 1. Glycérophosphatides . . . . .                                                                              | 13 |
| 2. Sphingophosphatides . . . . .                                                                              | 18 |
| ETUDE CHIMIQUE DES PHOSPHOLIPIDES DE<br>M. TUBERCULOSIS.                                                      |    |
| Travaux antérieurs . . . . .                                                                                  | 21 |
| PARTIE THEORIQUE                                                                                              |    |
| CHAPITRE I. - LES PHOSPHOLIPIDES DE M. PHLEI.                                                                 |    |
| Purification des phospholipides . . . . .                                                                     | 25 |
| Composition des phospholipides . . . . .                                                                      | 25 |
| Discussion des résultats . . . . .                                                                            | 28 |
| CHAPITRE II. CHIMIE DES PHOSPHOLIPIDES D'UNE SOUCHE<br>H-37 Rv STREPTOMYCINO-RESISTANTE . . . . .             | 31 |
| 1. Acide phosphatidique . . . . .                                                                             | 31 |
| 2. Phosphatidyl-inosito-di-D-mannoside . . . . .                                                              | 34 |
| Conclusion . . . . .                                                                                          | 37 |
| CHAPITRE III. - LES PHOSPHOLIPIDES DU BACILLE<br>CALMETTE-GUERIN (BCG). . . . .                               | 39 |
| A. - Etude des phospholipides d'une souche de BCG<br>cultivée sur milieu de Sauton . . . . .                  | 39 |
| Nouvelle méthode d'extraction . . . . .                                                                       | 39 |
| Structure du phosphatidyl-inosito-di-D-mannoside . .                                                          | 40 |
| B. - Etude des phospholipides d'un lot de BCG cultivé<br>sur milieu peptoné et glycérimé . . . . .            | 43 |
| Composition de l'hydrosoluble . . . . .                                                                       | 43 |
| Structure de l'inosito-dimannoside : nature de la<br>liaison mannose-mannose . . . . .                        | 46 |
| Nature de la liaison acide phosphorique-inositol ;<br>essais d'identification du phosphate d'inositol . . . . | 50 |

## TECHNIQUES EMPLOYEES

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| A. Chromatographie . . . . .           | 55 |
| B. Electrophorèse sur papier . . . . . | 56 |
| C. Techniques analytiques . . . . .    | 56 |

## PARTIE EXPERIMENTALE

### CHAPITRE I. - LES PHOSPHOLIPIDES DE M. PHLEI.

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| Purification des phospholipides . . . . . | 59 |
| Composition des phospholipides . . . . .  | 59 |

### CHAPITRE II. - LA CHIMIE DES PHOSPHOLIPIDES D'UNE SOUCHE H-37 R<sub>v</sub> STREPTOMYCINO-RESISTANTE.

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| Chromatographie du phosphatide brut . . . . . | 67 |
| Acide phosphatidique . . . . .                | 68 |
| Phosphatidyl-inosito-dimannoside . . . . .    | 71 |

### CHAPITRE III. - LES PHOSPHOLIPIDES DU BACILLE CALMETTE-GUERIN (BCG).

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A. - Etude des phospholipides d'une souche de BCG cultivée sur milieu de Sauton . . . . .       | 77 |
| Nouvelle méthode d'extraction . . . . .                                                         | 77 |
| Structure du phosphatidyl-inosito-di-D-mannoside . .                                            | 78 |
| B. - Etude des phospholipides d'un lot de BCG cultivé sur milieu peptoné et glycérimé . . . . . | 82 |
| Analyse préliminaire . . . . .                                                                  | 82 |
| Chromatographie sur papier du phosphatide . . . . .                                             | 83 |
| Composition de l'hydrosoluble . . . . .                                                         | 83 |
| Structure de l'inosito-di-D-mannoside; nature de la liaison mannose-mannose . . . . .           | 85 |
| Identification du phosphate d'inositol . . . . .                                                | 89 |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| RESUME ET CONCLUSIONS . . . . . | 91 |
|---------------------------------|----|

|                         |    |
|-------------------------|----|
| BIBLIOGRAPHIE . . . . . | 95 |
|-------------------------|----|

## DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

"La chimie du D-ribose et du désoxy-2-D-ribose"

---

Vu et approuvé :

Paris, le 8 Mai 1960

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH





